

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene der
Veterinärmedizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H.-J. Sinell

Serologischer Nachweis von Milcheiweiß in
hoherhitzten Fleischwaren

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

vorgelegt von
Renate Kluge-Wilm
Tierärztin aus Bad Polzin

Berlin 1967
Journal-Nr. 596



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene der
Veterinärmedizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H.-J. Sinell

Serologischer Nachweis von Milcheiweiß in
hocherhitzten Fleischwaren

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

vorgelegt von
Renate Kluge-Wilm
Tierärztin aus Bad Polzin

Berlin 1967
Journal-Nr. 596

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin



Dekan: Prof. Dr. G. Bergmann
Referent: Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. M. Lerche

Tag der Promotion: 11. Juli 1967

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	3
II. <u>Schrifttum</u>	4
a) Die technologische Bedeutung der Milcheiweiß-Verarbeitung in Fleischwaren	4
b) Zusammensetzung und immunologische Eigenschaften der Milcheiweiße	5
c) Hitzedenaturierung der Milcheiweiße	9
d) Bekannte Nachweismethoden für Milcheiweiße in Fleischwaren	14
1. chemische und biochemische Methoden	14
2. serologische Methoden	16
III. <u>Eigene Versuche</u>	19
a) Methodik	19
1. Antigenherstellung und Immunisierung	19
1.1 Antigene: Magermilch	19
Lab- und Säurekasein aufgeschlossenes Milcheiweiß (Gervita und Rovita)	
1.2 Immunisierungsmodus	20
1.3 Titerbestimmung	22
2. Indirekte Hämagglutination (i.H.)	23
2.1 Arbeitsmethode	23
2.2 Vorbereitung des Versuchsmaterials	25
2.3 Extraktherstellung	26
3. Immunelektrophorese (I.E.)	26
3.1 Arbeitsmethode	26
3.2 Vorbereitung des Versuchsmaterials	27
3.3 Extraktherstellung	28
b) Ergebnisse	29
1. Immunisierung	29
1.1 Immunisierung mit fraktionierten Milch- eiweißen	29
1.2 Immunisierung mit aufgeschlossenem Milcheiweiß: Rovita und Gervita	35
1.3 Zusammenfassung der Vorversuche zur Immunisierung	37
2. Indirekte Hämagglutination	37

2.1 Vorversuche mit Gervitalösungen	37
2.2 Ergebnisse der Hauptversuche mit Brühwürsten und hocherhitzten Handels- erzeugnissen	38
2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	41
3. Immunelektrophorese	41
3.1 Ergebnisse der Vorversuche	41
3.2 Ergebnisse der Hauptversuche	49
Modellbrühwürste	49
Hocherhitzte Fleischwaren	50
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	52
IV. <u>Diskussion</u>	54
1. Immunisierung	54
2. Extraktionsverfahren	55
3. Die Problematik der indirekten Hämagglutination	56
4. Die Nachteile anderer serologischer Methoden	58
5. Die Vorzüge der Immunelektrophorese	58
6. Die Problematik des quantitativen Nachweises mittels serologischer Methoden	60
V. <u>Zusammenfassung</u>	62
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	64

I. Einleitung

Die Verwendung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischwaren wird in Deutschland durch die Verordnung über Fleisch- und Fleischerzeugnisse (Fleisch-Verordnung) vom 19. Dezember 1959 geregelt.

Nach § 3 Nr.3 sind Fleischerzeugnisse, denen aufgeschlossenes Milcheiweiß zugesetzt wurde, als verfälscht anzusehen. Nach § 4 Abs.1 ist jedoch bei verschiedenen Erzeugnissen unter Kenntlichmachung die Verwendung von aufgeschlossenem Milcheiweiß bis höchstens 2 v.H. bezogen auf die verwendete Fleisch- und Fettmenge in luftdicht verschlossenen Behältnissen gestattet. Nach § 4 Abs.2 Nr.3 kann der Zusatz auch ohne besondere Kenntlichmachung bei bestimmten küchenmässigen Zubereitungen erfolgen. Die in der Fleisch-Verordnung festgesetzte Begrenzung des Milcheiweiß-Zusatzes auf 2% macht einen brauchbaren quantitativen Nachweis notwendig. Für die nach § 3 der Fleisch-Verordnung als verfälscht anzusehenden Fleischprodukte ist ein qualitativer Nachweis ausreichend. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem qualitativen und quantitativen serologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Brühwürsten und hochoerhitzten Fleischwaren, die in luftdicht verschlossenen Behältnissen in den Verkehr gebracht werden. Insbesondere soll die Anwendungsmöglichkeit der Immunelektrophorese (im folgenden mit I.E. bezeichnet) und der 1966 von KOTTER, HERRMANN u. CORSICO erarbeiteten quantitativen Nachweismethode mittels der indirekten Hämagglutination (im folgenden mit i.H. bezeichnet) geprüft werden.

Schrifttum

a) Die technologische Bedeutung der Milcheiweiß-Verarbeitung in Fleischwaren

Der Zusatz von geringen Mengen aufgeschlossenen Milcheiweißes zu einer hocherhitzten Fleischware führt zu einer Strukturverbesserung. Außerdem zeichnet sich die so hergestellte Ware durch eine bessere Verdaulichkeit und einen gewissen Ausgleich der thermisch bedingten Eiweißabwertung aus (1).

Proteine besitzen auf Grund ihrer Molekülstruktur, für die sowohl eine hydrophile als auch eine hydrophobe bzw. lipophile Gruppe charakteristisch ist, eine besondere Grenzflächenaktivität. Auf ihr beruht die Emulgatorwirkung von Proteinzusätzen zu miteinander unmischbaren Phasen, z.B. Fett und Wasser. Im Rahmen dieses Geschehens kommt dem Milcheiweiß besondere technologische Bedeutung bei der Herstellung hocherhitzter Fleischwaren zu. Hierbei wird das bei höheren Temperaturen austretende Fett ebenso wie das aus den Geweben freiwerdende Wasser gemeinsam mit den übrigen Bestandteilen der Fleischware stabil emulgiert. Das relativ hitzestabile aufgeschlossene Milcheiweiß substituiert dabei die hitzelabileren Muskelproteine, die im nativen Zustand ebenfalls wie Milcheiweiß Emulgatorwirkung besitzen.

In der homologen Emulsion liegt das Fett fein verteilt in Tropfen vor, die gitterartig und ringförmig von Eiweißmicellen umgeben sind. Durch spezifische Anfärbung des aus Milcheiweiß bestehenden Emulgators vor seinem Zusatz zu einem Brät gelang es, diese umgebenden Eiweißmicellen dem Emulgator zuzuordnen (2). Diese Eiweiß-Fett-Emulsion erweist sich als autoklavenfest, bei Deformierung durch Druck geben die zu einem Gitterwerk verdichteten Eiweißkörper wie eine bewegliche zusammenhängende Hülle nach, ohne aus dem Verband auszutreten. Beim Nachlassen der mechanischen Beeinflussung bildet sich wieder die ursprüngliche Kugelform zurück (3).

(1) KUTSCHER und PFAFF (1959)

(2) PFAFF (1959)

(3) PFAFF (1959)

KUTSCHER und PFAFF empfehlen, Hilfs- und Zusatzstoffe in erster Linie aus Lebensmitteln auszuwählen, die ernährungsphysiologisch dem wertbestimmenden Bestandteil der entsprechenden Fleischware ähneln oder gleichkommen. Ideal sind solche Mittel, die sowohl biologisch aufwertend als auch strukturverbessernd wirken (1). Milcheiweiß bietet sich aus vorgenannten Gründen als Zusatzstoff an. Die biologische Wertigkeit gleicht dem von Fleischeiweiß, und es besitzt eine größere Thermostabilität.

Der Zusatz von aufgeschlossenem Milcheiweiß zu einer Fleischware soll auf maximal 2% begrenzt werden, da höhere Zusätze keine weitere Qualitätsverbesserung bewirken. Die günstigste Qualitätsbeeinflussung wird durch Zusatz von 1,5 bis 1,8% erreicht (2).

b) Zusammensetzung und immunologische Eigenschaften der Milcheiweiße

Die Angaben über Milcheiweiße beziehen sich in dieser Arbeit - soweit nichts anderes vermerkt - auf Kuhmilcheiweiße. Eiweiße liegen in der Milch in kolloidalem Zustand vor. Ihr prozentualer Anteil an den Gesamtbestandteilen beträgt etwa 4%. Durch Säure- oder Labgerinnung gelingt eine Abtrennung des Kaseins von den Molkenproteinen (Milchserumproteine). Durch geeignete Trennungsmethoden lassen sich Kasein und Molkenproteine in zahlreichezelfraktionen zerlegen. Bei der Fraktionierung der Milchproteine wurden folgende Werte gefunden, die sich auf den prozentualen Anteil am Gesamtmilcheiweiß beziehen (3):

Kasein	76 - 84	%
α-Kasein	45 - 63	%
β-Kasein	19 - 28	%
γ-Kasein	3 - 7	%

-
- (1) KUTSCHER und PFAFF (1959)
(2) KUTSCHER und PFAFF (1961)
(3) BRUNNER und Mitarbeiter (1960); THOMPSON und Mitarbeiter (1965); KIERMEIER und KIRCHMEIER (1964)

Molkeneiweiß	14 - 24	%
Lactalbumin	11	%
Blutserumalbumin	0,7 - 1,3	%
β-Lactoglobulin A und B	7 - 12	%
α-Lactalbumin	2 - 5	%
Lactoglobulin		
Euglobulin	0,8 - 1,7	%
Pseudoglobulin	0,6 - 1,4	%
Proteose-Pepton-Fraktion	2 - 6	%
Glykomakropeptid-Fraktion	1 - 2	%

Die Proteose-Pepton-Fraktion läßt sich elektrophoretisch in drei Einzelkomponenten, α , β und γ -Proteose, trennen (1). Zusätzlich läßt sich aus Magermilch ein als Lactotransferrin bezeichnetes spezifisches Milchprotein isolieren, das mit Eisen einen lachsroten Komplex bildet und mit Red milk Protein identisch ist (2). Die α -Kaseinfraktion läßt sich durch geeignete Methoden in die calciumempfindlichen Subfraktionen α_{s1} und α_{s2} und die calciumstabilen Subfraktionen κ und λ zerlegen (3).

Auf Grund des genetischen Polymorphismus der Rindermilchproteine wurde ein Nomenklaturschema ausgearbeitet (4), welches die genetische Kennzeichnung mit einbezieht. Die Subfraktionen des Kaseins α_{s1} und κ , β -Kasein und β -Lactoglobulin kommen in den genetischen Varianten A, B und C und α -Lactalbumin in den Varianten A und B vor.

Eine Unterscheidungsmöglichkeit der genetischen Kaseinvarianten ist durch die relative Beweglichkeit in der Zonenelektrophorese gegeben (5). Bei den durch Agarelektrophorese getrennten β -Lactoglobulinen läßt sich feststellen, daß die Varianten A, B und C zwar die gleichen 162 Aminosäurekomponenten besitzen, die jedoch in ihrer Stellung zueinander minimal differieren (6).

Fraktionierungsmethoden, die auf den differenzierten chemischen oder physikalischen Eigenschaften der einzelnen Protein-

- (1) KIERMEIER und KIRCHMEIER (1964)
- (2) BLANC und ISLIKER (1961)
- (3) LINDQUIST (1963)
- (4) THOMPSON und Mitarbeiter (1965)
- (5) THOMPSON und Mitarbeiter (1965)
- (6) ASCHAFFENBURG (1965)

komponenten beruhen, geben keine Auskunft über deren antigene Beschaffenheit. Als geeignet zum Studium der antigenen Zusammensetzung der Milcheiweiße hat sich die Immunelektrophorese erwiesen. Die Anzahl und Lokalisation der im Agargel auftretenden Präzipitationsbanden zwischen elektrophoretisch aufgetrennten Milcheiweißen und dem homologen Antiserum sind der Maßstab für die Antigenzusammensetzung der einzelnen Milcheiweiße. Native Magermilch stellt sich dabei als ein Gemisch von 12 bis 14 Antigenen dar (1), die im Agargel eine entsprechende Anzahl von Präzipitaten unterschiedlicher Form und Lokalisation bilden. Durch selektive Absorption des Antikörper enthaltenden Anti-Kuhmilch-Serums mit bekannten Antigenen und durch Vergleich der Reaktionen zwischen Anti-Kuhmilch-Serum mit gereinigten Kuhmilch-Proteinen gelingt eine Zuordnung auftretender Präzipitate zu bestimmten Milchproteinen. So gelang die Identifizierung von mindestens 7 der 12 bis 14 Präzipitate, nämlich β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Serumalbumin, Immunglobulin, Red milk Protein und Kasein, dem zwei (2) oder drei Präzipitate zugeordnet werden können, die den immunologisch differenten α -, β - und γ -Kaseinfraktionen entsprechen könnten (3). Nach dem im I.E.-Diagramm des normalen menschlichen Blutserums bezeichneten Bereichen liegen in der Reihenfolge von Anode zur Kathode im Albuminbereich Rinderserumalbumin und β -Lactoglobulin, welches sich bis zum Antigenbassin erstreckt, im α_1 - und α_2 -Globulin-Bereich α - und β -Kasein und Red milk Protein, während α -Lactalbumin als langgestrecktes Präzipitat vom Albumin über α_1 und α_2 bis zum β_1 -Globulin-Bereich verläuft. Der Immunglobulin-Bogen beginnt anodisch in der Nähe des Antigen-Reservoirs im α_2 -Globulin-Bereich und durchzieht den β_1 - und β_2 - bis zum γ -Globulin-Bereich (4). Durch Absättigung des verwendeten Anti-Kuhmilch-Serums mit Rinderserum gelingt es, die milchspezifischen Proteine von denen zu trennen, die sowohl im Blut als auch in der Milch vorkommen. Mit derart abgesättigtem Antiserum bildet Magermilch nur noch 7 Präzipitate (5), davon

(1) HANSON und JOHANSON (1959); HANSON und MANSSON (1961); HANSON (1964); GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959)

(2) HANSON und MANSSON (1961); HANSON (1964)

(3) GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959)

(4) GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959)

(5) GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959); HANSON und JOHANSON (1959); HANSON (1964)

sind bekannt 2 bis 3 Kaseinfraktionen, β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin und Red milk Protein. Es fehlen dabei also 6 bis 7 Präzipitate, u.a. Serumalbumin und Immunglobulin. Die i.e. Analyse von Rinderserum mit Anti-Kuhmilch-Serum zeigt eben diese fehlenden 6 Antigene (1) bzw. 7 Antigene (2), von denen Blutserumalbumin und Immunglobulin identifiziert und nicht milchspezifisch sind. Weitere i.e. Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, daß aus der Milch isoliertes Albumin mit dem Blutserumalbumin serologisch identisch ist (3), ebenso wie Immunglobulin aus der Kuhmilch antigenanalytisch mit dem Rinderserum- γ -Globulin identisch ist (4). Man ist der Ansicht, daß Immunglobulin und Milchserumalbumin durch einfache Filtration aus dem Serum in die Milch gelangen (5), und sogar γ -Kasein soll bereits präformiert im Blut vorliegen (6), während der α -Kaseinkomplex, β -Kasein, α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin im Milchdrüsengewebe aus freien Aminosäuren synthetisiert werden (7). Kaseinfreies Kuhmilchserum enthält 8 (8) bis 9 (9) antigendifferente Proteine, die als Serumalbumin, β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Ceruloplasmin, Transferrin, Lactotransferrin (Red milk Protein), β_2 A-Globulin, Pseudoglobulin und Gammaglobulin identifiziert wurden (10). Milchspezifisch davon sind nur β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Lactotransferrin und Pseudoglobulin, während die übrigen Komponenten auch gleichzeitig im Rinderserum auftreten. Die Frage nach der Homogenität oder Heterogenität der bisher aufgefundenen einzelnen Milcheiweißantigene harret noch einer endgültigen Klärung; Angaben in der Literatur sind zum Teil widersprüchlich.

-
- (1) HANSON und JOHANSON (1959)
 - (2) GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959)
 - (3) COULSON und STEVENS (1950)
 - (4) GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959)
 - (5) GARNIER (1964); LARSON und GILLESPIE (1957)
 - (6) LARSON und GILLESPIE (1957); THOMPSON und Mitarbeiter (1965)
 - (7) LARSON und GILLESPIE (1957)
 - (8) GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959)
 - (9) BLANC (1963)
 - (10) BLANC (1963)

Das Elektropherogramm von Gesamtkasein zeigt die 3 elektro-phoretisch aufgetrennten Komponenten: α , β und γ , die in der I.E. jedoch zusammen nur ein Präzipitat bilden. Daraus wird geschlossen, daß nur die α -Fraktion Antikörper bildet, während die β - und γ -Fraktion dazu nicht befähigt sein sollen (1). Andere Autoren fanden, daß nach der Methode von HIPP und Mitarb. hergestelltes α -Kasein in der I.E. bei Reaktion mit dem kompletten Anti-Kuhmilch-Serum allein drei Präzipitate bildet (2), was auf die antigenanalytische Heterogenität der α -Kaseinfraktion hinweist.

Kristallines β -Lactoglobulin scheint ein einheitliches Antigen zu sein, denn in der I.E. entsteht mit Anti-Kuhmilch-Serum nur ein Präzipitationsbogen (3). Es scheint auch bewiesen zu sein, daß die genetischen Varianten A, B und C des bovinen β -Lactoglobulin immunologisch einheitlich sind. In der Doppeldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY und in der I.E. bilden alle drei Varianten nur einen Bogen gegen das Antiserum A, B und C (4).

Kristallines β -Lactalbumin reagiert mit Anti-Kuhmilch-Serum nur mit einer einzigen Präzipitationsbande (5). Auch durch Sephadex G-75 in drei unterschiedlich schnell bewegliche Komponenten aufgetrenntes α -Lactalbumin bildet in der I.E. nur ein Präzipitat. Es ist also offensichtlich immunologisch einheitlich (6) und nicht ein Antigen-Gemisch.

c) Hitzedenaturierung der Milcheiweiße

Der serologische Nachweis von Milcheiweiß steht in enger Verbindung zur Frage der Denaturierung der Milcheiweiße durch gewerbeübliche Erhitzungsverfahren bei der Herstellung von Fleischwaren. Hitzedenaturiertes Eiweiß ist serologisch kaum noch reaktionsfähig. Auch für Milcheiweiße gilt das. Über ihre Hitzestabilität finden sich in der Literatur folgende An-

- (1) AURAND, BROWN und LECCE (1963)
- (2) GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959); HANSON u. JOHANSON (1959)
- (3) GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959); HANSON u. JOHANSON (1959)
- (4) BELL und McKENZIE (1964)
- (5) HANSON und JOHANSON (1959)
- (6) PREAUX und Mitarbeiter (1965)

gaben: Werden Proteine über einen kritischen Punkt hinaus erhitzt, so wird ihre native Konfiguration zerstört. Die Folge ist eine Veränderung ihrer charakteristischen Eigenschaften (1). Native Proteine bestehen aus Polypeptidketten, die durch Salz- und Wasserstoffbrücken in einer ganz bestimmten, für jedes Protein spezifischen Konfiguration gehalten werden. Durch denaturierende Einflüsse, z.B. Hitze, kommt es zur Zerstörung der Wasserstoff- oder Disulfidbrücken. Aus der ehemals nativen, geordneten, gerollten oder gefalteten Struktur entsteht eine entrollte, entfaltete willkürliche Konfiguration, wobei gleichzeitig Molekülgruppen (z.B. SH-Gruppen) frei und damit chemisch aktiv werden; man bezeichnet diesen letzten Vorgang als Demaskierung reaktiver Gruppen (2). Der Endzustand des denaturierten Proteins ist abhängig von der Anzahl der zerstörten Brücken und ihrer Bedeutung für die Strukturhaltung des Moleküls. Unabhängig von Art und Dauer des denaturierenden Einflusses sind also für den Prozeß der Denaturierung die individuellen Eigenschaften des Proteins bestimmend (3).

Bedeutungsvoll für den serologischen Nachweis von Proteinen ist der enge Zusammenhang zwischen Denaturierung, Löslichkeit und serologischer Aktivität. Übereinstimmend wird in der Literatur berichtet, daß ein wichtiges Kennzeichen der Hitzedenaturierung in der Verminderung der Löslichkeit der betreffenden Proteine besteht (4). Unterschiedliche Aussagen werden jedoch über die Beziehungen zwischen Denaturierung und serologischer Aktivität gemacht. Einige Autoren (5) sprechen von vollkommenem Verlust oder fast völliger Abnahme der serologischen Spezifität und Aktivität, während andere beobachtet haben, daß durch Erhitzen von Eiweißgemischen antigen wirkende

(1) JENESS und PATTON (1959)

(2) JAENICKE (1965)

(3) STAUFF (1960)

(4) FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ (1951); HAUROWITZ (1960); JAENICKE (1965); JENESS u. PATTON (1959); H. SCHMIDT (1955); SINELL (1960); STAUFF (1960)

(5) FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ (1951); HAUROWITZ (1960); JAENICKE (1965); JENESS u. PATTON (1959); STAUFF (1960)

Substanzen mit einer neuartigen Spezifität entstehen (1).

H. SCHMIDT berichtet von mehreren Möglichkeiten des Einflusses der Denaturierung auf die antigenen Fähigkeiten des Eiweißes, wobei es entweder zur Änderung der Spezifität durch zusätzlich erworbene Spezifität oder zum Verlust der Spezifität im Sinne der Entartung oder zum Verlust jeder antigenen Wirkung kommen kann. Es gibt gewisse Denaturierungen, die auch ohne beträchtliche Spezifitätsänderungen stattfinden können (2).

In den letzten Jahren durchgeführte elektrophoretische oder i.e. Untersuchungen an hitzedenaturierten Milcheiweißen haben ergeben, daß die größte Milcheiweißfraktion, das Kasein, im Gegensatz zu den übrigen Milcheiweißen sehr hitzestabil ist. Die Intensität des denaturierenden Einflusses schwankt je nach Höhe und Dauer der Temperatureinwirkung und dem Feuchtigkeitsgrad des zu untersuchenden Materials (3). So wurde auch bei der Milch eine Abhängigkeit der Hitzestabilität von der Zusammensetzung festgestellt, wobei die Gerinnungszeit bei 130°C je nach Laktationsstadium zwischen 11 bis 38 Min. variierte. Zum Beginn und Ende der Laktation ist die Gerinnungszeit niedriger (4).

In der Literatur existiert für jedes Milcheiweiß eine Vielzahl von Werten der Denaturierungstemperatur. Sie lassen sich häufig schlecht vergleichen, weil die Temperatur-Zeit-Funktion bei jedem Autor variiert erscheint.

Mit Hilfe von quantitativen elektrophoretischen Untersuchungen wurden folgende Denaturierungstemperaturen, die für eine Zeitdauer von 30 Min. gelten, für einzelne Molkenproteine gefunden (5):

Immunglobulin	etwa 70°C
Serumalbumin	etwa 74°C
β -Lactoglobulin	etwa 90°C
α -Lactalbumin	etwa 96°C, während die Proteose-

Pepton-Fraktion bei Temperaturen von 96°C keinerlei Neigung zur Denaturierung zeigt. Die Tabelle 1 gibt Auskunft über die mit Hilfe von i.e. Untersuchungen gewonnenen Denaturierungs-

-
- (1) KLECZKOWSKI (1941)
 - (2) H.SCHMIDT (1955)
 - (3) ROULET, BEIN u.v. MURALT (1961)
 - (4) ABD EL-SALAM (1965)
 - (5) LARSON und ROLLERI (1955)

Autoren	Protein	Temperatur	Zeit
HANSON u. MANSSON ROULET, BEIN u.v. MURALT AURAND, BROWN u. LECCE	Immunoglobulin Immunoglobulin Immunoglobulin	75°C 80°C 88°C oder 105°C	15 Minuten einige Sekunden 15 Sekunden 2 Sekunden
HANSON u. MANSSON ROULET, BEIN u.v. MURALT AURAND, BROWN u. LECCE	Serumalbumin Serumalbumin Serumalbumin	80°C 100°C 127°C	15 Minuten 10 Minuten 15 Sekunden
HANSON u. MANSSON AURAND, BROWN u. LECCE	α -Lactalbumin α -Lactalbumin	120°C 105°C oder 127°C	15 Minuten 15 Sekunden 2 Sekunden
HANSON u. MANSSON AURAND, BROWN u. LECCE	β -Lactoglobulin β -Lactoglobulin	120°C 149°C	15 Minuten 15 Sekunden
HANSON u. MANSSON	Red milk Protein	95°C	15 Minuten

Die Tabelle 1 zeigt eine kurze Zusammenfassung einiger Literaturangaben über die zur Denaturierung von Molkenproteinen notwendigen Temperaturen und deren Einwirkungsdauer. Die angegebenen Werte denaturieren die Proteine soweit, daß bei i.e. Untersuchungen keine Präzipitatabildung mehr erfolgt.

temperaturen der Molkenproteine.

Die Literaturangaben über die Hitzestabilität der Kaseinfraktionen stimmen weitgehend überein. I.E.-Untersuchungen zeigten, daß trotz Temperaturen zwischen 60 und 120°C nach 15 Min. (1) und selbst nach 15 Sek. bei 150°C (2) Kasein noch Präzipitate bildet, die denen aus nativem völlig gleichen. Entsprechende Beobachtungen wurden am Kasein aus unterschiedlich pasteurisierter Milch, aus Sprüh- und Walzenmilchpulver und einigen Baby-Milchpulvern gemacht (3).

Bei der elektrophoretischen Untersuchung der einzelnen Kaseinfraktionen α , β und γ , die nach MELLANDER getrennt wurden, stellte sich heraus, daß Temperaturen, bei denen 85-90% der Molkenproteine ausflocken, bei α -Kasein nur zum Vorstadium der Ausflockung führen, während β - und γ -Kasein weitgehend nativ bleiben. Sterilisation denaturiert α - und β -Kasein partiell, während γ -Kasein noch unverändert bleibt (4).

Als eine ebenfalls besonders hitzestabile Kaseinfraktion hat sich bei weiteren Untersuchungen die κ -Fraktion erwiesen (5).

Mit der Frage der durch Temperatureinflüsse veränderten Kaseinstruktur hatten sich JENNES und PATTON eingehend beschäftigt. Sie gaben folgende Darstellung dieses Problems: Kaseine werden häufig als undenaturierbar bezeichnet, weil sie auch bei Temperaturen zwischen 60 und 100°C selbst nach 5 Std. noch unverändert bleiben. Wird Kasein in Abwesenheit anderer Proteine erhitzt, so ändert sich seine Löslichkeit, Viskosität und optische Drehung nicht in dem Maße wie dies bei der Hitzedenaturierung der Molkenweiße bekannt ist. Offensichtlich liegen Kaseine in mehr oder weniger regellos entfalteten Strukturen vor, die für eine Hitzedenaturierung weniger empfänglich sind als die eng gefalteten und spezifischen Strukturen der Molkenweiße und anderer Proteine. Hitzeveränderungen des Kaseins

(1) HANSON und MANSSON (1961); HANSON (1964)

(2) AURAND, BROWN u. LECCE (1963)

(3) HANSON und MANSSON (1961)

(4) KARTE (1965)

(5) D.G. SCHMIDT (1964)

unterliegen einem anderen Mechanismus als die Molkenproteine. Bei Temperaturen von 120°C kommt es zwar zur Verminderung der Löslichkeit des Kaseins, wobei die veresterten Phosphatgruppen abgespalten werden und der Nicht-Protein-Stickstoff erhöht wird. Dieser Vorgang ist keine Denaturierung im herkömmlichen Sinne, die mit einer intramolekularen Veränderung der Konfiguration mit Hydrolyse kovalenter Bindungen eingeht. Es wird deshalb vorgeschlagen, die Bezeichnung "Hitzedenaturierung" im Hinblick auf Kasein zu vermeiden (1).

Ein weiteres Untersuchungsteam studierte das Verhalten der Kaseinfraktionen α_s , κ und β unter hoher Temperatureinwirkung und stellte fest, daß die Freisetzung von Nicht-Protein-N durch Hitze bei β -Kasein kleiner ist als bei den anderen beiden Fraktionen. Die Phosphorabspaltung weist hingegen nur geringe Unterschiede bei den drei Fraktionen auf. Eine Temperatureinwirkung von 140°C führt nach 60 Min. zur Abspaltung des gesamten Phosphors (2).

Beim Erhitzen von Milch oder Gemischen aus Kasein und Molkenproteinen sind Komplexbildungen oberhalb einer bestimmten Temperatur beobachtet worden. Derartige Interaktionen sind vom β -Lactoglobulin bekannt mit Gesamtkasein (3), mit α -Kasein (4), mit κ -Kasein (5) sowie mit α -Lactalbumin (6). Die Komplexbildungen gehen auf Reaktionen von Sulfhydryl- und Disulfidgruppen zurück, die bei Hitzeeinwirkungen von α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin frei werden und miteinander reagieren (7).

d) Bekannte Nachweismethoden für Milcheiweiß in Fleischwaren

1. chemische und biochemische Methoden

Aus der Literatur sind chemische bzw. biochemische und serolo-

-
- (1) JENESS u. PATTON (1959)
 - (2) UMEO YOSHINO u. Mitarb. (1964)
 - (3) ROSE (1965); JENESS u. PATTON (1959)
 - (4) MORR (1965)
 - (5) ZITTLE, THOMPSON, CUSTER u. CERBULIZ (1962); HARTMANN u. SWANSON (1965)
 - (6) HUNZIKER u. TARASSUK (1965)
 - (7) ZITTLE, THOMPSON, CUSTER u. CERBULIZ (1962); HUNZIKER u. TARASSUK (1965); JENESS u. PATTON (1959)

gische Methoden zum Nachweis von Milcheiweiß bekannt.

KUTSCHER, NAGEL und PFAFF erarbeiteten 1961 eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen, die auf der Bestimmung des Phosphorprotein-Phosphors im Kasein nach vollständiger Entfernung aller anderen Phosphorbestandteile des Materials beruht.

STADELMANN (1962) stellte allerdings bei der Anwendung der Methode nach KUTSCHER, NAGEL und PFAFF in der analytischen Praxis fest, daß ein sicherer Nachweis und die quantitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen nur innerhalb einer Fehlergrenze von 10% möglich ist. Als Unsicherheitsfaktor wird u.a. die unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen aufgeschlossenen Milcheiweiße angegeben, die je nach Ausgangsmaterial und Aufschließungsverfahren einen unterschiedlichen Phosphorprotein-Phosphorgehalt zwischen 0,63 und 0,72% aufweisen.

LIENHOP (1962) wies mit der Methode von KUTSCHER, NAGEL und PFAFF Milcheiweiß nach, das in einer Versuchsherstellung Fleischwaren in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt worden war. Die wiedergefundenen Milcheiweißwerte wichen jedoch erheblich von den zugesetzten Mengen ab. Ein Unterschied in der Feststellung des Milcheiweißes bei Produkten verschiedener Erhitzungsgrade konnte dabei nicht ermittelt werden.

THALACKER bestimmte in einer 1963 erstmals beschriebenen Methode ebenfalls den Phosphorgehalt des Phosphorprotein-Phosphors in milcheiweißhaltigen Fleischerzeugnissen. In sterilisierten Versuchsproben wurden jedoch nur 70% der zugesetzten Menge wiedergefunden, während es beim unerhitzten Brät 100% waren. Diese Differenz wird mit der Veränderung der Phosphorprotein-Eigenschaften des Kaseins während der Erhitzung in Gegenwart tierischer Gewebsproteine erklärt. THALACKER empfahl deshalb diese Methode nur für den Nachweis nichtdeklarerter Zusätze von Milcheiweiß oder beim Überschreiten des erlaubten deklarierten Zusatzes.

Van BAAL und LEGET (1965) beschrieben ein Verfahren zum qualitativen Nachweis von Kasein und Natriumkaseinat in Fleischprodukten auf der Basis der Papierelektrophorese. Das Fleisch-

produkt wurde getrocknet, entfettet, in Veronalpuffer extrahiert, der gebildete Niederschlag gefällt, in 3%iger Natriumoxalatlösung gelöst und elektrophoretisch untersucht. Kaseinbanden auf dem Papierstreifen waren charakteristisch für den Zusatz von Milcheiweiß zu Fleischwaren. Bei dieser Methode war die Reinigung des chemisch vorbehandelten Extraktes durch Natriumoxalat wesentlich. Chemisch ähnlich aufgebaute Stoffe wie Soja- und Hühnereiweiß beeinflussten danach den Kaseinnachweis nicht.

2. Serologische Methoden

Das Prinzip serologischer Nachweismethoden von Eiweißen in Gemischen beruht auf einer außerhalb des tierischen Organismus stattfindenden Antigen-Antikörper-Reaktion. Diese AG-AK-Reaktion ist nach STAUFF (1960) eine spezifische Reaktion zwischen zwei kolloidalen Substanzen, die miteinander reagieren unter Bildung von Aggregaten, die makroskopisch als unlösliche Substanzen ausfallen bzw. eine leichte Trübung hervorrufen. "Die Antigen-Antikörper-Reaktionen sind reziproker Natur in dem Sinne, daß mittels bekannter Antigene ein Antikörper oder mittels bekannter Antikörper (z.B. diagnostisches Immuneserum) ein Antigen nachweisbar sein kann." (1)

Mit Hilfe der biologischen Eiweißdifferenzierung, die auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht, gelingt es, Eiweiße in Gemischen auf Grund ihrer serologischen Affinität zu den Antikörpern eines spezifischen Antiserums zu identifizieren.

Zur biologischen Eiweißdifferenzierung werden und wurden verschiedene Verfahren erarbeitet, die größtenteils auf der Präzipitation basieren. So führte UHLENHUTH die Präzipitation im Röhrchen ein, wobei das Antiserum mit dem fraglichen Extrakt (= Antigen) unter- oder überschichtet wurde. Eine ablaufende AG-AK-Reaktion äußert sich durch Ringbildung an der Berührungsstelle. Außer der Ringpräzipitation haben andere Präzipitationsmethoden, die modifiziert und teilweise mit anderen Methoden kombiniert wurden, Eingang in die Untersuchungs-

(1) H. SCHMIDT (1955)

technik gefunden.

LOUDIN (1946) empfahl, das Immunserum mit einer Agarlösung zu mischen und mit einer Antigenlösung zu überschichten. Je nach der Anzahl der stattfindenden AG-AK-Reaktionen entstanden eine oder mehrere Präzipitationsbanden. OUCHTERLONY (1958) ließ in einem Agargel Antigen und Antikörper, die auf einer Platte in vorgeformte Löcher im Gel gefüllt wurden, miteinander reagieren. Gegenüber der Ringpräzipitation hat die Methode nach OUCHTERLONY den Vorteil, schwache Reaktionen besser sichtbar machen zu können.

Eine Kombination der Präzipitation mit der Elektrophorese stellt die 1953 von GRABAR und WILLIAMS ausgearbeitete Originalmethode der Immunelektrophorese dar, die von SCHEIDEGGER (1955) als Mikromethode variiert wurde.

Für den serologischen Nachweis von Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren sind empfindliche Methoden notwendig. Die Schwierigkeiten des Nachweises liegen in der Herstellung brauchbarer Antiseren, die einen ausreichend hohen Titer gegen hitzeverändertes Milcheiweiß besitzen und deren Spezifität die Reaktion mit Muskel- und Serumproteinen ausschließt. Weitere Schwierigkeiten bestehen darin, die für den serologischen Nachweis erforderlichen Mengen Milcheiweiß in Lösung zu bringen.

Serologische Nachweisverfahren für Milcheiweiß sind erarbeitet worden auf der Grundlage der Diffusionsmethode nach OUCHTERLONY, der Immunhistochemie, der indirekten Hämagglutination und der Immunelektrophorese.

WYLER und SIEGRIST (1965) gelang mit Hilfe der Diffusionsmethode nach OUCHTERLONY, einen qualitativen Nachweis für aufgeschlossenes Milcheiweiß und Magermilchpulver in Fleischwaren zu führen bis zu einem Zusatz von 0,1%. Diese Methode basierte auf der serologischen Reaktion im Agargel zwischen einem antikörperhaltigen Natrium-Kaseinat-Antiserum, das mit Rinder Serum abgesättigt ist, und den als Antigen fungierenden Fleischextrakten, denen aufgeschlossenes Milcheiweiß bzw. Magermilchpulver zugesetzt wurde und die im positiven Fall gemeinsam eine Präzipitationslinie im Agargel bilden. Die Ver-

fasser nahmen an, daß aus der Stärke der Präzipitationslinie kein Rückschluß auf die Milcheiweißkonzentration in der Fleischware gezogen werden kann. Der Einfluß der Herstellungstemperatur des Fleischproduktes auf die serologische Reaktion wurde nicht erörtert.

HOLPERT (1965) führte einen qualitativen Nachweis aufgeschlossenen Milcheiweißes auf histochemischem Wege durch, wobei Gefrierschnitte milcheiweißhaltiger Fleischprodukte mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt wurden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigten die entsprechenden AG-AK-Komplexe eine punktförmige Fluoreszenzerscheinung.

KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1965) beschrieben den quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren auf der Grundlage der indirekten Hämagglutination. Mit Hilfe der Anti-Milcheiweiß-Seren war es möglich, einen Zusatz ab 0,1% von aufgeschlossenem Milcheiweiß in bis auf 115°C erhitztem Material quantitativ zu erfassen.

HANSON (1964) erarbeitete eine immunologische Technik für die qualitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischwaren. Mit Hilfe der "comparativen Immunelektrophorese" wurde dabei das Antigenmuster zwischen elektrophoretisch aufgetrenntem Kuh-Kolostrum mit durch Rinderserum abgesättigtem Anti-Kuh-Kolostrum-Serum durch Zugabe einer dritten Komponente in das Agar-Gel beurteilt. Diese dritte Komponente bestand aus dem zu prüfenden Untersuchungsmaterial. Im Falle eines Milcheiweißzusatzes wurde die serologische Reaktion zwischen dem abgesättigten Anti-Kolostrum-Serum und Kolostrum gestört, was durch die Ablenkung und uncharakteristische Ausbildung der Präzipitate im Gel sichtbar wurde. Die comparative I.E. soll einen Trockenmilchzusatz bis zu 0,1% zum zu untersuchenden Material noch ermitteln können.

I. Eigene Versuche

a) Methodik

1. Antigenherstellung und Immunisierung

1.1 Antigene

Die für die Durchführung der Immunisierung benötigte **Magermilch** wurde aus Vorzugsmilch gewonnen, die durch Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge und durch anschließende Filtration entfettet wurde, 48stündige Dialyse (Cellophan-Dialysierschlauch von Kalle, ϕ 38 mm, Nr.700581 400) gegen fließendes Wasser ergab eine lactosefreie Magermilch, der Lactosenachweis nach Dische (1927) war negativ. Die Aufbewahrung der Magermilch erfolgte im lyophilisierten Zustand.

Die Herstellung des **Säurekasein** fand nach folgender Arbeitsweise statt: Die in der Kühlzentrifuge bei $+4^{\circ}\text{C}$ durch zweimaliges Zentrifugieren (20 Min., 10 000 U/min) entfettete Vorzugsmilch wurde zusätzlich durch Watte filtriert und im Verhältnis 1:1 mit aqua dest. verdünnt. Anschließende Säurefällung erfolgte durch Zugabe von 0.1 n HCl bis zum Erreichen des pH-Wertes 4.6 und Aufbewahrung dieser Lösung für 1 Stunde im Brutschrank (37°C) und 16 Std. im Kühlschrank ($+4^{\circ}\text{C}$). Das säuregefällte Kasein ließ sich von der Säuremolke durch Zentrifugieren (30 Min., 4 000 U/min) trennen, wurde 5 x mit aqua dest. gewaschen und lyophilisiert.

Die Gewinnung von **Labkasein** ging von der gleichen Magermilch aus, deren Herstellung bereits bei der Gewinnung von Säurekasein beschrieben wurde. 800 ml Magermilch wurden durch Zusatz von 20 g Labferment während der Aufbewahrungszeit von 2 1/2 Std. im Brutschrank (37°C) und 16 Std. im Kühlschrank ($+4^{\circ}\text{C}$) ausgelabt, der Bodensatz mehrfach mit aqua dest. gewaschen, zentrifugiert und lyophilisiert.

Autoklavierte Magermilch, Lab- und Säurekasein wurden durch Temperatureinwirkung vor der Lyophilisierung hergestellt. Dabei wirkte im Versuchsautoklaven 20 Min. eine Temperatur von 119 bis 120°C auf das feuchte Untersuchungsgut ein. Der Versuchsautoklav gestattet eine exakte Kontrolle

der Temperatur im Zentrum des Untersuchungsmaterials. Das A u f s c h l i e ß e n der Kaseine geschah in folgender Arbeitsweise: 1 g lyophilisiertes Kasein (Lab- oder Säurekasein, roh oder autoklaviert) wurde mit 20 ml aqua dest. im Ultra-Turrax homogenisiert und über dem Magnetrührer tropfenweise mit 0.1 n NaOH versetzt bis aus der milchigen Aufschwemmung eine klare Lösung entstanden war. Dazu ist ein pH-Wert von etwa 10.4 notwendig. Durch tropfenweisen Zusatz von 0.1 n HCl in die ständig bewegte Lösung wurde der Neutralpunkt angestrebt, und zwar so lange, bis das Kasein kurz vor der erneuten Ausfällung steht (etwa pH 7.3). Die nunmehr schwach getrübbte Kaseinlösung wurde zentrifugiert, der klare Überstand als aufgeschlossenes Kasein lyophilisiert. Die aufgeschlossenen Milcheiweißpräparate Gervita SN4 und Rovita FN 5 wurden aus dem Handel bezogen. Gervita SN 4 fand teilweise auch im gekochten Zustand für die Immunisierung Verwendung. Dazu wurden 75 g Gervita in 600 ml aqua dest. 15 Min. gekocht, unter fließendem Wasser sofort abgekühlt und lyophilisiert.

1.2 Immunisierungsmodus

Die für den serologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß notwendigen Antiseren wurden von Kaninchen mittels unterschiedlicher Immunisierungsmodi und unter Verwendung verschiedener als Antigen wirkender Milcheiweißbestandteile gewonnen. Die Tiere besaßen ein Mindestalter von 6 Monaten, ein Durchschnittsgewicht von 3,5 kg und waren klinisch gesund. Das Geschlecht der Kaninchen fand keine Berücksichtigung. Zu Beginn jeder Immunisierung fand eine Probepräzipitation zwischen dem Normalserum des Versuchstieres und dem zu verwendenden Antigen sowie Normalserum und Muskelextrakten von Rind, Pferd und Schwein statt, um unspezifisch reagierende Tiere von den Versuchen auszuschließen.

Bei der Herstellung von A n t i - M a g e r m i l c h - S e r e n wurde sowohl rohe (Kan. 1,2,3,4) als auch autoklavierte (Kan. 5,6,7,8) lyophilisierte Magermilch benutzt, die anfangs in zweitägigem Abstand in einer Menge von 6 x 50 mg i.v. ver-

abreicht wurde. Danach erfolgten innerhalb einer Woche drei intravenöse Injektionen einer Mischung aus jeweils 100 mg lyophilisierter Magermilch, roh (Kan.1 und 2) oder autoklaviert (Kan.5 und 6) und 2 ml verdünnter Aluminiumhydroxyd-Lösung nach WILLSTÄTTER. Zwei Wochen danach fand eine Boosterinjektion statt, wobei jedem Tier i.v. 200 mg lyophilisierte Magermilch in 2 ml phys.NaCl gelöst und s.c. 800 mg in 4 ml verdünntem $Al(OH)_3$ nach WILLSTÄTTER verabfolgt wurden. Die Kaninchen 5 und 6 wurden 7 Tage nach der Boostierung und nach Titerüberprüfung entblutet, während die Kaninchen 1 und 2 zwecks Titerverbesserung nochmals 200 mg rohe Magermilch in verdünnter Aluminiumhydroxyd-Lösung nach WILLSTÄTTER i.v. erhielten. Eine zweite Gruppe von 4 Kaninchen erhielt nach dem gleichen Injektionsplan gleiche Antigenmengen, jedoch ohne Aluminiumhydroxyd, wobei die Kan. 3 und 4 mit roher und die Kan. 7 und 8 mit autoklavierter Magermilch behandelt wurden.

Zur Gewinnung von A n t i s e r e n g e g e n L a b k a s e i n fand lyophilisiertes aufgeschlossenes Labkasein sowohl im rohen (Kan.9 und 10) als auch im autoklavierten Zustand (Kan. 11) Verwendung. In zwei- bis dreitägigem Abstand erhielten die Tiere 9 i.v. Injektionen, die jeweils 25 mg Antigen in 1,5 ml phys. NaCl gelöst, enthielten. Fünf Tage nach der letzten Dosis fand nach der Titerüberprüfung die Entblutung der Versuchstiere statt.

A n t i - S ä u r e k a s e i n - S e r e n wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit aufgeschlossenem Säurekasein, roh (Kan.12 und 13) oder autoklaviert (Kan.14 und 15) hergestellt, wobei 8 i.v. Injektionen von jeweils 25 mg Antigen im Abstand von 2 Tagen verabreicht wurden. Titerbestimmung und Ausblutung der Tiere folgten am 5.Tag nach der letzten Injektion.

Die Herstellung von A n t i - R o v i t a - S e r e n (Kan. 16 und 17) gelang durch 5 i.v. Injektionen von jeweils 40 mg Rovita in 3 ml phys.NaCl, die 3 x wöchentlich erfolgten. Titerüberprüfung und Ausblutung fanden 1 Woche nach der letzten Injektion statt.

Zur Gewinnung von A n t i - G e r v i t a - S e r e n fanden zwei Immunisierungsmodi Anwendung. Bei dem ersten erhielten insgesamt 4 Kaninchen rohes (Kan.20 und 21) oder gekochtes (Kan.26 und 27) Gervita in 8 i.v. Injektionen in zweitägigem Abstand. Jede Einzeldosis bestand aus in 3 ml phys.NaCl gelöstem Gervita von jeweils 75 mg.

Der zweite Immunisierungsmodus zur Gewinnung von Antiseren gegen rohes und gekochtes Gervita schloß die kombinierte Anwendung von Antigen mit FREUNDSchem Adjuvans ein. Verwendet wurde Bacto-Adjuvant Complete Freund der Firma DIFCO. Dieses Adjuvans ist eine Emulsion aus Paraffinöl mit einem Stabilisator (Lanolinderivat), der eine Suspension von Mycobacterium butyricum zugesetzt ist.

Zu Beginn dieser Immunisierungsart wurden jedem Tier i.c. 2 ml einer Suspension verabreicht, die aus 4 mg Gervita, roh (Kan.18 und 19) oder gekocht (Kan.22,23,24,25), 1 ml phys. NaCl und 1 ml FREUNDSchem Adjuvans bestand. Nach Ablauf von 2 Wochen folgte ein dreitägiges Immunisieren, wobei am 1. Tag 10 mg Gervita s.c., am 2. Tag und am 3. Tag jeweils 10 mg Gervita i.v. in jeweils 3 ml phys.NaCl gegeben wurden. Nach weiteren 8 Tagen erfolgten die Titerüberprüfungen und das Ausbluten der Kaninchen aus der Vena jugularis.

1.3 Titerbestimmung

Die Titerbestimmung der Antiseren erfolgte mittels der Präzipitationsmethode im Röhrchen nach UHLENHUTH im α -Verfahren (1). Dazu wurde das zu prüfende unverdünnte Antiserum vom Kaninchen mit den nach Biuret-Eiweißgehalt auf 0.1 g % eingestellten und geometrisch verdünnten Antigenen vorsichtig in einem englumigen Röhrchen überschichtet. Das Ablesen der Reaktion erfolgte nach 20 Minuten gegen einen schwarzen, schräggestellten Hintergrund. Im positiven Fall entstand ein weißer Ring an der Berührungsstelle zwischen Antigen und Antiserum. Jedes Antiserum wurde sowohl mit dem zur Immunisierung ver-

(1) DEAN u. WEBB (1926)

wendeten Antigen (= homologes Antigen) als auch mit heterologen Antigenen überprüft. So wurden die Antiseren gegen Magermilch, Kasein, Rovita und Gervita gegen Normalseren und Muskelextrakte vom Rind, Pferd und Schwein austitriert.

Als Titer eines Antiserums wird diejenige Verdünnung des entsprechenden Antigens angegeben, bei der nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten gerade noch ein ringförmiges Präzipitat im Röhrchen entsteht.

Der homologe Titer bezieht sich auf das Antigen, welches zur Herstellung des zu prüfenden Antiserums Verwendung fand.

2. Indirekte Hämagglutination (i.H.)

2.1 Arbeitsmethode

Die Durchführung der indirekten Hämagglutination zum Nachweis von Milcheiweiß erfolgte nach der von KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966) angegebenen Arbeitsweise.

Frisches, durch Schütteln mit Glasperlen defibriniertes Hammelblut wurde dreimal mit phys.NaCl gewaschen, zentrifugiert und etwa 12 Std. bei + 4°C aufbewahrt. 5 ml gewaschene Erythrozyten wurden mit 17,5 ml phys.NaCl und tropfenweise mit 2,5 ml einer frischen 0,1%igen Tanninlösung versetzt, nach 15 Min. abzentrifugiert und dreimal mit phys.NaCl gewaschen. Das Erythrozyten-Sediment wurde mit phys.NaCl auf 25 ml aufgefüllt. Zur Sensibilisierung wurden 5 ml der tanninbehandelten Erythrozyten mit 5 ml einer 0,5 bzw. 1,5%igen Gervita-Lösung versetzt, die zuvor mit 0,5 ml gewaschenen Erythrozyten zentrifugiert wurde.

Zur Sensibilisierung der Erythrozyten für den Nachweis von rohem Milcheiweiß wurde eine 0,5%ige rohe Gervitalösung, für den Nachweis von erhitztem Milcheiweiß eine 1,5%ige auf 70°C erhitzte Gervitalösung benutzt.

Die 0,5%ige bzw. 1,5%ige Gervitalösung wirkte 2 Std. im Brutschrank auf die tanninbehandelten Erythrozyten ein. Die so sensibilisierten Erythrozyten wurden dreimal mit phys.NaCl gewaschen, zentrifugiert und das Sediment mit phys.NaCl auf 20 ml aufgefüllt.

Die zur Verwendung kommenden Anti-Gervita-Seren von Kaninchen wurden 30 Min. bei 56°C im Wasserbad gehalten und zur Absättigung heterologer Agglutinine dreimal mit 10 Vol.-% gewaschenen Erythrozyten vermischt und danach zentrifugiert. Zum Ansatz der indirekten Hämagglutinationsreaktion wurden 0,5 ml Anti-Gervita-Serum und 0,25 ml Untersuchungsextrakt (Gervitalösung bzw. Extrakte aus Fleischwaren) zusammengegeben; diese Mischung wurde 1 Std. bei 37°C im Brutschrank gehalten, danach abzentrifugiert und 0,5 ml des Überstandes mit phys.NaCl geometrisch verdünnt.

Etwa 8 Verdünnungsreihen ließen sich gleichzeitig bearbeiten. In dieser Anzahl sind je eine positive und eine negative Serumkontrolle enthalten. Die positive Kontrolle wurde mit 0,5 ml Antiserum und 0,25 ml einer 2%igen Gervitalösung, die negative Kontrolle mit 0,5 ml Antiserum und 0,25 ml phys.NaCl angesetzt und geometrisch verdünnt. Die negative Kontrolle gibt den Hämagglutinationstiter des verwendeten Antiserums an. Die Bezeichnung "positiv" und "negativ" bezieht sich also im Gegensatz zur Arbeit von KOTTER, HERRMANN u. CORSICO (1966) nicht auf die eintretende Hämagglutination, sondern auf das Vorhandensein von Milcheiweiß in der Kontrolle. Neben den Serumkontrollen wurde in den Hauptversuchen jeweils eine Extraktkontrolle durchgeführt, die mit einem Extrakt einer milcheiweißfreien Fleischware angesetzt wurde. Jedes Röhrchen der 8 Verdünnungsreihen erhielt einen Zusatz von 0,1 ml sensibilisierten Erythrozyten. Die Röhrchen blieben 1 Std. im Brutschrank, das Ablesen der Reaktion fand nach etwa 16stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur statt. Die Beurteilung der Reaktion geschah nach der Verminderung des Hämagglutinationstiters in den einzelnen Verdünnungsreihen gegenüber dem Hämagglutinationstiter der negativen Serum- bzw. Extraktkontrolle. Je höher die Milcheiweiß-Konzentration im Untersuchungsextrakt, desto stärker ist auch die Absättigung der Antikörper des benutzten Antiserums. Der daraus resultierende geringere Antikörper-Überschuß führt zur Verminderung des Hämagglutinationstiters.

2.2 Vorbereitung des Versuchsmaterials

Zur Durchführung der Versuche wurde das in phys. NaCl gelöste aufgeschlossene Milcheiweiß Gervita SN 4 benutzt.

Als Untersuchungsmaterial für die Hauptversuche dienten Modellbrühwürste mit unterschiedlichem Milcheiweiß-Zusatz, eine Versuchsanfertigung einer Rindfleischkonserve mit und ohne Milcheiweißzusatz sowie verschiedene hocherhitzte Handelserzeugnisse.

Die Brühwürste wurden aus Bockwurstbrät der laufenden Produktion einer hiesigen Fleischwarenfabrik mit einem Zusatz von 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 und 4,0% Gervita hergestellt. Brät und Milcheiweiß wurden sorgfältig mit der Hand gemischt, mit Hilfe einer einfachen Handspritze in Saitlinge gefüllt, gekennzeichnet, geräuchert und 20 Min. bei 85°C gebrüht. Das Bockwurstbrät besaß vor dem Milcheiweiß-Zusatz einen Wassergehalt von 56,57%, festgestellt mit dem Feuchtigkeitsmesser Ultra X System GRONERT. Jede Charge mit gleichem Milcheiweiß-Zusatz wurde nochmals in Einzelportionen von 50 g unterteilt (bezogen auf das Einfüllgewicht vor dem Räuchern und Brühen), in Plastikbeuteln verschweißt und bei -20°C aufbewahrt.

Als hocherhitztes Material wurde eine Rindfleischkonserve untersucht, die mit einem Zusatz von 4% aufgeschlossenem Milcheiweiß hergestellt worden war; als Kontrolle diente eine Rindfleischkonserve ohne Zusatz.

Im Handel käuflich erworben wurden hocherhitzte Fleischwaren, deren Zusatz von aufgeschlossenem Milcheiweiß mit 1 bis 2% kenntlich gemacht war. Verwendet wurden in zahlreichen Wiederholungsversuchen 6 Dosen Leberwurst, 4 Dosen Frühstücksfleisch, 3 Dosen Schinkenwurst, 2 Dosen Lebercreme, 1 Dose Bierwurst und 1 Dose Rotwurst (ohne Milcheiweiß, als Kontrolle). Innerhalb einer Gruppe waren jeweils unterschiedliche Fabrikate verschiedener Firmen vertreten, d.h. bei Leberwurst z.B. wurden 6 qualitativ unterschiedliche Fabrikate mehrerer Herstellerfirmen untersucht.

2.3 Extraktherstellung

Die für die Durchführung der Hauptversuche notwendigen Extrakte aus Brühwürsten, Rindfleisch und hochoverhitzten Fleischwaren wurden teilweise nach der Arbeit von KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966) hergestellt und teilweise nach den für die Immunelektrophorese erarbeiteten verkürzten Extraktionsverfahren.

Bei der erstgenannten Arbeitsweise wurde das Untersuchungsmaterial im Mixer fein zerkleinert und in Dialysierschläuche (KALLE) gebracht. Es folgte eine 24stündige Dialyse gegen häufig gewechseltes aqua dest. und anschließende Lyophilisation.

Das Lyophilisat wurde im Verhältnis 1:2 (bezogen auf das Feuchtgewicht des Untersuchungsgutes) mit phys. NaCl vermischt und 48 Std. bei $+4^{\circ}\text{C}$ extrahiert, anschließend zentrifugiert (30 Min., 5 000 U/min) und der Überstand filtriert.

Die zweite, weniger arbeitsaufwendige Methode zur Extrakterstellung fand ohne Dialyse und Lyophilisation statt.

5 g des im Mixer feinzerkleinerten Untersuchungsgutes wurden mit 5 ml kochender phys. NaCl versetzt, kräftig durchgeschüttelt und 24 Std. bei Zimmertemperatur extrahiert. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren (30 Min., 5 000 U/min) und die Filtration des Überstandes.

3. Immunelektrophorese (I.E.)

3.1 Arbeitsmethode

In den vorliegenden Versuchen wurde die Immunelektrophorese-Ausrüstung 6800 A der Firma LKB Stockholm nach der dazugehörigen Arbeitsanleitung benutzt. Die Apparatur ermöglicht auf dem Objektträger eine mikroelektrophoretische Analyse nach der von SCHEIDEGGER (1955) eingeführten Mikromethode.

Auf einem gleichmäßig mit einem 1%igen gepufferten Agar beschichteten Objektträger wurden mit Hilfe einer Spezialstanzform pro Objektträger zwei runde Antigenbassins mit einem Durchmesser von 1 mm und eine dazwischenliegende 1 mm breite

und 6,5 cm lange Rinne zur Aufnahme des Antiserums ausgestanzt. Die beiden Antigenbassins wurden mit jeweils 1 bis 2 μ l der zu untersuchenden Substanz gefüllt, die anschließend im elektrischen Feld (220 V, 50 mA) innerhalb 1 Stunde aufgetrennt wurden.

Die AG-AK-Reaktion begann, nachdem 0,04 ml Antiserum in die vorgeformte Rinne gegeben wurden. Das Antiserum diffundierte innerhalb von 20 Stunden gegen das beidseitig der Antiserumrinne gelegene elektrophoretisch aufgetrennte Untersuchungsmaterial (= Antigene). Überschüssiges, nicht präzipitiertes Protein wurde anschließend durch Eintauchen der Objektträger jeweils 24 Stunden in phys.NaCl und aqua dest. entfernt. Sichtbar wurde die AG-AK-Reaktion durch das Entstehen opalisierender Präzipitate im Agar-Gel, die, nachdem die Präparate vollkommen getrocknet worden waren, zur Verdeutlichung mit Amidoschwarz angefärbt wurden.

Das mit Hilfe der I.E. untersuchte Material wurde nach der Lokalisation, dem Verlauf und der Stärke der entstehenden Präzipitationsbanden beurteilt. Die Identifizierung und Bezeichnung der gefundenen Präzipitate stützt sich auf die in der Arbeit von GUGLER, BEIN u.v. MURALT (1959) zugrunde gelegten Bezeichnungen der Milchproteine.

3.2 Vorbereitung des Versuchsmaterials

Magermilch, Lab- und Säurekasein, Säuremolke, Rinderserum und Rindermuskelextrakt sowie Gervita und Rovita wurden als Untersuchungsmaterial für die Vorversuche in der Immunelektrophorese benutzt, während für die Hauptversuche Extrakte aus Modellbrühwürsten, Rindfleischkonserven und hocherhitzten Handelserzeugnissen als Versuchsmaterial dienten. (Die verschiedenen Milcheiweiße sind bereits bei der Antigenherstellung zur Immunisierung beschrieben worden). Zur Verwendung in der immunelektrophoretischen Methode wurden die verschiedenen Milcheiweiße in phys.NaCl gelöst und zentrifugiert, anschließend wurde der Biuret-Eiweißgehalt des Überstandes bestimmt. Vergleichende Untersuchungen der Löslichkeit von Gervita in

aqua dest., phys.NaCl, Natronlauge, Natriumacetat und Natriumoxalat ergaben keine ausreichend unterschiedlichen Resultate, die die bevorzugte Anwendung eines dieser Lösungsmittel angezeigt erscheinen ließe; so wurden auch die relativ schwer löslichen aufgeschlossenen Milcheiweiße Rovita und Gervita in phys.NaCl gelöst zur I.E. verwendet. Durch etwa 24stündiges Auslaugen feinzerkleinerter, tiefgefrorener Rindermuskulatur in phys.NaCl wurden Rindermuskel-extrakte hergestellt; anschließende Filtration durch Papier-faltenfilter ergab hellgelbe bis schwach rötliche, durchsich-tige Extrakte, deren Eiweißgehalt mittels der Biuret-Methode bestimmt wurde. Bei den Rinderseren handelte es sich um tief-gefrorene, unverdünnte Normalseren klinisch gesunder Kühe. In den Hauptversuchen kamen bei der Immunelektrophorese die gleichen Modellbrühwürste, Rindfleischkonserven und die hoch-erhitzten Handelserzeugnisse zur Anwendung wie bei der indi-rekten Hämagglutination.

3.3 Extraktherstellung

Die in den Hauptversuchen immunelektrophoretisch untersuchten Modellbrühwürste, Rindfleischkonserven und hocherhitzten Han-delserzeugnisse mit unterschiedlichem Milcheiweißzusatz wur-den nach verschiedenen Methoden extrahiert.

Anfangs wurde der Extrakt nach der von KOTTER und Mitarb. an-gegebenen Methode für die indirekte Hämagglutination (siehe dort) hergestellt. Eigens für die Immunelektrophorese wurden mehrere Extraktionsverfahren angewendet, die sich jeweils nur in einigen Variationen voneinander unterschieden.

Es wurden variiert:

die Extraktionsmittel	(phys.NaCl oder Natriumoxalat)
die Extraktionsdauer	(24 oder 48 Stunden)
die Dialyse	(keine Dialyse oder 24stündige Dialyse des Extrakts)

Alle Extraktionen, die speziell für die immunelektrophoreti-schen Untersuchungen geprüft wurden, fanden bei Zimmertempe-ratur statt. Eine vorherige Lyophilisation des Untersuchungs-materials wurde nicht durchgeführt. Alle Extrakte wurden 30 Min. bei 5 000 U/min zentrifugiert und durch Faltenfilter

filtriert, anschließend erfolgte die Bestimmung des Biuret-Eiweißgehaltes.

Die Extraktionen wurden wie folgt angesetzt:

5 g im Mixer fein zerkleinertes Material wurden mit 5 ml kalter oder kochender phys. NaCl oder heißgesättigter Natriumoxalat-Lösung im Zentrifugenglas kräftig geschüttelt, daran schloß sich die Extraktion in einer Zeitdauer von 24 bzw. 48 Stunden, danach erfolgten Zentrifugierung und Filtration und teilweise noch eine 24stündige Dialyse gegen häufig zu wechselndes aqua dest., das ständig mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten wurde.

b) Ergebnisse

1. Immunisierung

Als Maßstab für den Erfolg der Immunisierung mit Milcheiweiß gilt die Gewinnung eines qualitativ hochwertigen Antiserums, wobei sich Qualität durch einen möglichst hohen homologen Titer und durch ausreichende Spezifität ausdrückt.

1.1 Immunisierung mit fraktionierten Milcheiweißen

Der durchschnittliche homologe Titer der 4 Antiseren (Kan.1, 2,3,4), die mit roher Magermilch hergestellt wurden, betrug 1:16 000, der höchste 1:32 000. Bei gleicher Anzahl mit autoklavierter Magermilch behandelter Kaninchen (Kan.5,6,7,8) wurde überwiegend ein homologer Titer von 1:64 000 erreicht (Tabelle 2). Die mit unerhitzter Magermilch hergestellten Antiseren reagierten auch gleichzeitig mit autoklavierter Magermilch, jedoch mit einem schwächeren Titer. Die gleichen serologischen Beziehungen bestanden zwischen den mit autoklavierter Magermilch hergestellten Antiseren und roher Magermilch, jedoch erreichten diese Titer die gleiche Höhe der homologen.

Die Antiseren 1 bis 4 präzipitierten rohes Säurekasein bis zu einer Verdünnung von 1:4 000, bezogen auf den Biuret-Eiweißgehalt, die Antiseren 5 bis 8 jedoch noch in den weitaus höheren Verdünnungen bis 1:32 000.

Serologische Reaktionen mit Rinderserum traten sowohl bei mit unerhitzter als auch mit autoklavierter Magermilch hergestellten Antiseren auf, die jedoch stärker ausgeprägt waren bei den Antiseren, die durch autoklaviertes Material gewonnen worden waren, wobei eines sogar mit Rindermuskelextrakt (1:1 000) ein Präzipitat bildete.

Magermilch enthält sowohl Kasein als auch Molkenproteine, von denen Serumalbumin und Immunglobulin nicht milchspezifisch sind, d.h. auch im Serum vorkommen. Die Reaktionen der Anti-Magermilch-Seren mit Rinderseren und Rindermuskelextrakt sind aus diesem Grunde nicht als unspezifisch zu beurteilen, schließen jedoch eine Anwendung dieser Antiseren zum Nachweis von Milcheiweiß in Fleischwaren aus.

Die Präzipitation von Rindermuskelextrakt läßt sich auf Serumreste in der Muskulatur zurückführen, dieser Titer ist auch stets geringer im Vergleich zu dem des Rinderserums.

Antikörper gegen Normalseren und Muskelextrakte von Pferd und Schwein konnten in den Anti-Magermilch-Seren mittels der Ringpräzipitation nicht nachgewiesen werden.

Die zusätzliche intravenöse Anwendung von Aluminiumhydroxyd nach WILLSTÄTTER als Adjuvans erbrachte keine besseren Resultate (Kan.1,2,5 und 6) als die alleinige i.v. Gabe von Antigen (Kan.3,4,7,8).

Die Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über das Präzipitationspektrum der mit den Kaseinen hergestellten Antiseren von Kaninchen.

Ein Unterschied in der serologischen Aktivität zwischen Lab- und Säurekasein ist nicht feststellbar. Die Höhe der homologen Titer ist im Durchschnitt etwa gleich. Auffallend war auch hier wieder der Unterschied in Titerhöhe und Spezifität zwischen mit autoklaviertem und unerhitztem Ausgangsmaterial hergestellten Antiseren. Die Antiseren 11,14 und 15 besaßen einen höheren homologen Titer (überwiegend 1:64 000) als die Antiseren 9, 10, 12 und 13 (überwiegend 1:16 000).

Wie schon bei Magermilch beobachtet, scheint auch autoklaviertes Kasein eine bessere Antikörperproduktion anzuregen als unerhitztes. Die mit autoklaviertem Lab- und Säurekasein

Tabelle 2

Kan. bzw. AS-Nr.	Antigen +)	Mag. roh	Mag. auto- klaviert	Säurekasein roh	RS	RM	PS	SS	PM	SM
1	1800 mg Mag. roh + Al(OH) ₃	1:16000	1: 2000	1: 4000	--	--	--	--	--	--
2	1800 mg Mag. roh + Al(OH) ₃	1:32000	1: 8000	1: 4000	1:32000	--	--	--	--	--
3	1600 mg Mag. roh	1:16000	1: 1000	1: 4000	1: 2000	--	--	--	--	--
4	1600 mg Mag. roh	1: 8000	1: 1000	1: 4000	1: 2000	--	--	--	--	--
5	1600 mg Mag. autokl. + Al(OH) ₃	1:64000	1:64000	1:32000	1:128000	1:1000	--	--	--	--
6	1600 mg Mag. autokl. + Al(OH) ₃	1:32000	1:32000	1: 8000	--	--	--	--	--	--
7	1600 mg Mag. autokl.	1:64000	1:64000	1:16000	1: 4000	1:1000	--	--	--	--
8	1600 mg Mag. autokl.	1:64000	1:64000	1: 8000	1:64000	1:1000	--	--	--	--

+) Die Mengenangaben beziehen sich auf die gesamte dem betreffenden Kaninchen verabreichte Antigendosis

Abkürzungen:

Kan. = Kaninchen
AS = Antiserum
Mag. = Magermilch

RS = Rinderserum
PS = Pferdeserum
SS = Schweineserum

RM = Rindermuskelextrakt
PM = Pferdemuskelextrakt
SM = Schweinemuskelextrakt

Tabelle 3

Kan. bzw. AS-Nr.	Antigen ^{+))}	Lab- kasein roh	Lab- kasein autokl.	Säure- kasein roh	Mag. roh	Mag. autokl.	RS	RM	PS	SS	PM	SM
9	225mg Labkasein roh	1:32000	1: 2000	1: 8000	1:64000	1: 1000	1: 8000	--	--	--	--	--
10	225mg Labkasein roh	1:16000	1: 4000	1: 4000	1:32000	1: 1000	1: 8000	--	--	--	--	--
11	225mg Labkasein autokl.	1:64000	1:64000	1:64000	1:64000	1:32000	--	--	--	--	--	--
		Säure- kasein roh	Säure- kasein autokl.									
12	200mg Säure- kasein roh	1:16000	1:16000		1: 8000	1: 4000	1:64000	1:1000	--	--	--	--
13	200mg Säure- kasein roh	1:16000	1:16000		1: 8000	1: 4000	1:16000	--	--	--	--	--
14	200mg Säure- kasein autokl.	1:32000	1:64000		1: 1000	1: 1000	--	--	--	--	--	--
15	200mg Säure- kasein autokl.	1:32000	1:32000		1: 1000	1: 1000	--	--	--	--	--	--

Abkürzungen siehe Tabelle 2

Tabelle 4

Kan. bzw. AS-Nr.	Antigen +)	Rovita	Säure- kasein roh	Mager- milch roh	RS	PS	SS	RM	PM	SM
16	200mg Rovita roh	1: 32000	1: 8000	1: 8000	1: 32000	--	--	--	--	--
17	200mg Rovita roh	1:256000	1:32000	1:32000	1:128000	--	--	1:1000	--	--

Abkürzungen siehe Tabelle 2

Tabelle 5

Kan. bzw. AS-Nr.	Antigen +) bzw. AS-Nr.	Gervita roh	Gervita gekocht	Lab- kasein roh	Lab- kasein autokl.	RS	PS	SS	RM	PM	SM
18	34mg Gervita roh + FREUNDsches Adjuvans	1:256000	1:128000	1: 64000	1:128000	1:128000	--	--	1:2000	--	--
19	34mg Gervita roh + FREUNDsches Adjuvans	1:256000	1:128000	1: 64000	1: 64000	1: 64000	--	--	--	--	--
20	600mg Gervita roh	1: 16000	1: 16000	1: 2000	1: 2000	1: 32000	--	--	--	--	--
21	600mg Gervita roh	1:256000	1:128000	1:128000	1: 64000	1: 32000	--	--	--	--	--
22	34mg Gervita ge- kocht + FREUND- sches Adjuvans	1:128000	1:128000	1: 32000	1: 32000	--	--	--	--	--	--
23	34mg Gervita ge- kocht + FREUND- sches Adjuvans	1: 64000	1: 64000	1: 16000	1: 32000	--	--	--	--	--	--
24	34mg Gervita ge- kocht + FREUND- sches Adjuvans	1:256000	1:256000	1: 64000	1:128000	1: 32000	--	--	1:2000	--	--
25	34mg Gervita ge- kocht + FREUND- sches Adjuvans	1:256000	1:256000	1: 64000	1:128000	--	--	--	--	--	--
26	600mg Gervita gekocht	1: 64000	1: 32000	1: 2000	1: 4000	--	--	--	--	--	--
27	600mg Gervita gekocht	1: 64000	1: 32000	1: 2000	1: 4000	--	--	--	--	--	--

hergestellten Antiseren präzipitierten auch rohes Kasein, rohe und autoklavierte Magermilch, jedoch fast ausschließlich mit geringerem Titer als dem homologen. Die entsprechenden Beobachtungen wurden auch bei durch unerhitztes Kasein gewonnenen Antiseren gemacht. Bei letztgenannten Anti-Kasein-Seren traten durchweg Präzipitationen mit Rinder Serum, zum Teil auch mit Rindermuskelextrakt auf, die teilweise sogar den homologen Titer überstiegen. Diese Reaktionen sind als unspezifisch zu beurteilen, da weder Lab- noch Säurekasein Serumalbumin oder Immunglobulin enthalten, die in der rohen Magermilch vorkommen. Geht man jedoch von der Annahme aus, daß auch γ -Kasein bereits präformiert im Blut vorliegt (1), so wären diese unspezifischen Reaktionen erklärlich. Da aber die Präzipitationen nur bei unerhitztem Ausgangsmaterial auftraten, ist es wahrscheinlicher, daß dafür Antikörper weniger hitzestabiler Eiweiße als γ -Kasein verantwortlich sind.

Anti-Kasein-Seren, die mit Rinder Serum und Rindermuskelextrakten reagieren, sind für den Nachweis von Milcheiweiß in Fleischwaren ungeeignet.

1.2 Immunisierung mit aufgeschlossenem Milcheiweiß Rovita und Gervita

Von zwei Tieren, die mit unerhitztem Rovita FN 5 durch i.v. Applikation immunisiert wurden (Tabelle 4), besaß eines den für die in Aussicht genommenen Versuche ausreichend homologen Titer 1:256 000. Ein unspezifischer Titer von 1:128 000 gegen Rinder Serum und 1:1 000 gegen Rindermuskelextrakt lassen jedoch dieses Antiserum für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischwaren ungeeignet erscheinen.

Die beiden Immunisierungsmodi für die Gewinnung von Anti-Gervita-Seren erbrachten unterschiedliche Resultate in Bezug auf die Höhe der homologen Titer (Tabelle 5). Die Kaninchen 20, 21, 26 und 27, die mehrmals i.v. mit insgesamt 600 mg Gervita pro Tier immunisiert wurden, lieferten durchschnitt-

(1) LARSON und GILLESPIE (1957)

lich schwächere homologe Titer als die Kaninchen 18, 19, 22, 23, 24 und 25, die mit nur 34 mg Gervita jedoch zusammen mit FREUNDschem Adjuvans behandelt wurden.

Bei der letzten Immunisierungsart wurden von 6 Tieren 4 Antiseren mit einem homologen Titer von 1:256000, 1 Antiserum mit 1:128000 und 1 Antiserum mit 1:64000 gewonnen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, wie wenig die Höhe des homologen Titers von der Menge des zur Immunisierung verwendeten Antigens abhängig war und dafür die Applikationsart und die Auswahl geeigneter Adjuvantien einen entscheidenden Einfluß auf die Titerhöhe ausübten. Die Antiseren 18, 19, 20 und 21 reagierten außer mit dem homologen Antigen (Gervita, roh) mit gekochtem Gervita, rohem und autoklaviertem Kasein und Rinderserum, jedoch mit schwächerem als dem homologen Titer. Die Antiseren 22, 23, 24 und 25 besaßen gegen rohes Gervita einen ebenso hohen Titer wie gegen das homologe Antigen (Gervita, gekocht).

Bei der Beurteilung der Spezifität der Anti-Gervita-Seren bestätigte sich die bereits bei den Anti-Kasein-Seren gemachte Beobachtung, daß alle mit rohem Ausgangsmaterial immunisierten Tiere (Kan. 18, 19, 20, 21) einen gegen Rinderserum, teilweise auch gegen Rindermuskelextrakt gerichteten Antikörpergehalt aufwiesen, der allerdings größtenteils niedriger war als der gegen das homologe Antigen gerichtete. Hingegen reagierte von 6 Kaninchen, die mit gekochtem Gervita immunisiert wurden, nur ein einziges mit Rinderserum und Rindermuskelextrakt, allerdings ebenfalls nur in relativ niedrigen Antigenverdünnungen gemessen an dem homologen Titer.

Ein Antiserum, das in hervorragender Weise die Ansprüche an eine ausreichende Titerhöhe (1:256000) und hohe Spezifität erfüllt, war das mit 34 mg gekochtem Gervita unter gleichzeitiger Anwendung von FREUNDschem Adjuvans hergestellte Anti-Gervita-Serum Nr. 25.

1.3 Zusammenfassung der Vorversuche zur Immunisierung

Bei der Herstellung von Antiseren zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischwaren wurden Magermilch, Lab- und Säurekasein, Rovita und Gervita sowohl im rohen als auch im erhitzten Zustand in unterschiedlichen Immunisierungsmodi benutzt. Die Auswahl der Antiseren, deren Anwendung in der indirekten Hämagglutination und Immunelektrophorese vorgesehen war, fand nach den beiden Kriterien, Höhe des homologen Titers und Spezifität, statt. Als ausreichend wurde ein Titer von 1:128000 angesehen. Die Spezifität wurde nach der negativen Präzipitationsreaktion mit Normalseren und Muskelextrakten von Rind, Pferd und Schwein beurteilt. Auffallend war, daß sich besonders die mit erhitztem Ausgangsmaterial hergestellten Antiseren durch hohe homologe Titer und ausreichende Spezifität auszeichnen. Als besonders erfolgreich erwies sich die Immunisierung mit gekochtem Gervita zusammen mit FREUNDSchem Adjuvans, das Antiserum 25 mit einem homologen Titer von 1:256000 und hoher Spezifität ist ein Beispiel dafür.

Die Herstellung von Antiseren gegen Magermilch und Kaseine war weniger erfolgreich. Die homologen Titer waren zu gering, außerdem traten häufig unspezifische Reaktionen mit Rinderseren auf.

2. Indirekte Hämagglutination

2.1 Ergebnisse der Vorversuche mit Gervitalösungen

Die Tabellen 6 und 7 zeigen die Ergebnisse der in verschiedenen Konzentrationen untersuchten unerhitzten und 30 Min. auf 70°C erhitzten Gervitalösungen.

Wie aus Tabelle 6 (unerhitztes Gervita) ersichtlich ist, besaß das Anti-Gervita-Serum 25 einen Hämagglutinationstiter von 1:4096 (negative Kontrolle) bei Verwendung einer 0,5%igen rohen Gervitalösung zur Sensibilisierung der Erythrozyten. Mit steigender Gervitakonzentration wurde der Hämagglutinationstiter des Serums stufenweise erniedrigt bis zum Wegfall

jeglicher Hämagglutinationserscheinungen bei einer 2%igen Milcheiweißkonzentration (= positive Kontrolle). Mit Hilfe der i.H. war es möglich, Konzentrationsabstufungen von 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 und 2% unerhitzter Gervitalösungen zu unterscheiden. Die Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse bei Verwendung von auf 70°C erhitzter Gervitalösung. Das Anti-Gervita-Serum besaß hier einen Hämagglutinationstiter von 1:8192 (Tabelle 6 nur 1:4096), da die Erythrozyten mit einer 1,5%igen erhitzten Gervitalösung sensibilisiert wurden. Die Reaktionen waren in höherer Verdünnung stärker ausgeprägt als bei entsprechenden Verdünnungen von rohem Gervita (vgl. Tabelle 6). Mit Hilfe der i.H. war es möglich, auch erhitzte Gervitalösungen in den Konzentrationen von 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 und 2% quantitativ zu erfassen.

2.2 Ergebnisse der Hauptversuche mit Brühwürsten und hoch-erhitzten Handelserzeugnissen

Bei der Untersuchung der Brühwurstextrakte mittels der i.H. konnten im Gegensatz zu den Vorversuchen unterschiedliche Milcheiweißkonzentrationen im Bereich zwischen 0,25 und 2,0% nicht sicher unterschieden werden. Häufig differierten die Hämagglutinationserscheinungen der negativen Kontrolle (Antiserum und NaCl) und der Extraktkontrolle (Antiserum und Brühwurst ohne Milcheiweiß) bei gleicher Verdünnungsstufe, obwohl sie eigentlich genau hätten übereinstimmen müssen. Es konnten sogar paradoxe Erscheinungen beobachtet werden: Niedere Milcheiweißzusätze erniedrigten den Hämagglutinationstiter mehr als höhere. Einige Male konnte sogar bei Brühwürsten mit 0,25% Milcheiweißzusatz statt der erwarteten Hämagglutinationstiter-Verminderung gegenüber der Kontrolle eine Erhöhung beobachtet werden.

Bei der Untersuchung von milcheiweißhaltigen hocherhitzten Handelserzeugnissen sowie von Rindfleischkonserven traten regellose Verminderungen des Hämagglutinationstiters auf, die ebenfalls unabhängig von der Höhe des Milcheiweißzusatzes waren. Die Beobachtungen wurden bei allen Anti-Gervita-Seren

Untersuchungsmaterial:
unerhitzte Gervitalösung

Tabelle 6

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1 024	2 048	4 096	8 192	16 384	32 768	65 536	131 072	262 144
negative Kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
positive Kontrolle	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gervitalösung 0,1%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,2%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,3%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,7%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0%	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

neg. Kontrolle = 0,5 ml Antiserum 25 + 0,25 ml phys. NaCl

pos. Kontrolle = 0,5 ml Antiserum 25 + 0,25 ml rohe 2%ige Gervitalösung

Untersuchungsmaterial:
erhitzte Gervitalösung
(30 Min. auf 70° C erhitzt)

Tabelle 7

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1 024	2 048	4 096	8 192	16 384	32 768	65 536	131 072	262 144
negative Kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
positive Kontrolle	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gervitalösung 0,1%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,2%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,3%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,7%	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0%	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

neg. Kontrolle = 0,5 ml Antiserum 25 + 0,25 ml phys. NaCl

pos. Kontrolle = 0,5 ml Antiserum 25 + 0,25 ml 2%ige erhitzte Gervitalösung

(22, 23 und 25) gemacht. Ein quantitativer Nachweis von Milcheiweißzusätzen war weder in Brühwürsten noch in hoch-erhitzten Fleischwaren möglich.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die von KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966) für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischwaren modifizierte Methode der i.H. ermöglichte in eigenen Versuchen eine quantitative Differenzierung von roher und auf 70°C erhitzter Gervitalösung in den Konzentrationen zwischen 0,1 und 2% (bezogen auf den Biuret-Eiweißgehalt).

Die Höhe des Milcheiweißzusatzes war mit Hilfe der i.H. in Brühwürsten und auch in hocherhitzten Fleischwaren nicht zweifelsfrei quantitativ zu erfassen. In einigen Fällen schien der qualitative Nachweis fraglich.

3. Immunelektrophorese

3.1 Ergebnisse der Vorversuche

Das Ziel der Vorversuche war die Prüfung der in den Hauptversuchen zum Nachweis von Milcheiweiß in Fleischprodukten benutzten Anti-Gervita-Seren und der quantitative Nachweis unterschiedlich konzentrierter Lösungen von aufgeschlossenem Milcheiweiß.

Bei der immunelektrophoretischen Untersuchung mit Hilfe des hochspezifischen Anti-Gervita-Serums 25 bildete sowohl Säure- als auch Labkasein auf der Anodenseite im Kaseinbereich eine deutlich ausgeprägte kurze, symmetrisch gekrümmte Präzipitationslinie. Im Gegensatz dazu scheinen autoklaviertes Säure- und Labkasein stark verändert zu sein, denn sie bildeten nur ein schwächer anfärbbares, sehr langgestrecktes, fast ungekrümmtes Präzipitat, welches sich anodisch vom Antigenbassin längs der Antiserum-Rinne bis fast zu deren Ende erstreckt. Es hat den Anschein, als wäre die elektrophoretische Auftrennung des autoklavierten Materials durch das Vorliegen von Denaturierungsprodukten erschwert und führte zu dieser für das Kasein untypischen Lokalisation im Agargel. Der Anti-

Körpergehalt des Antiserums war ausreichend, um noch mit den gelöst vorliegenden autoklavierten Kaseinen sichtbare Präzipitate zu bilden.

Magermilch bildete bei einer Eiweißkonzentration von 1% ein langes, flaches, dicht neben der Antiserum-Rinne liegendes Präzipitat, mit über dem Antigenbassin herausragendem, kathodischem, geschwungenem Bogenende.

Rinderserum und Rindermuskelextrakte formten bei der immunoelektrophoretischen Untersuchung keine Präzipitate mit dem Anti-Gervita-Serum 25. Diese Tatsache war maßgebend für die Anwendung dieses Antiserums zum serologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischwaren..

Die immunoelektrophoretischen Untersuchungen von Gervita- sowie Rovita-Verdünnungsreihen mit unverdünnten Anti-Gervita-Seren zeigten, daß die Ausbildung der Präzipitate in starker Abhängigkeit zur Antigenkonzentration erfolgte.

Bei der Verwendung von rohem Gervita in einer Antigenkonzentration von 4% (bezogen auf den Biuret-Eiweißgehalt) in phys. NaCl entstand in der Anwendung mit dem Antiserum 25 im anodischen Bereich des Agargels ein stark ausgebildetes, flachgewölbtes Präzipitat, dessen anodisches Ende im β -Lactoglobulin-Bereich in einen kräftigen, stark gebogenen und einen flacheren Schenkel gespalten war, das kathodische Ende verlief über das Antigenbassin hinaus zwischen diesem und der Antiserum-Rinne liegend und erschien undeutlich zerfasert. Dieser langgezogene Bogen durchzog also den β -Lactoglobulin-, Kasein- und α -Lactalbuminbereich. Mit abnehmender Antigenkonzentration verkürzte sich anfangs nur das kathodische ab 0,5% auch das anodische Schenkelende, während der im Kaseinbereich liegende zentrale Teil des Präzipitats als kürzer, gleichmäßig gekrümmter Bogen erhalten blieb. So war eine quantitative Unterscheidung zwischen rohen Gervitalösungen von 2,0% bis hinunter zu 0,01% mit Hilfe der I.E. möglich (vgl. Abb. 1 bis 8); rohes Gervita war qualitativ bis zu einer Verdünnung von 0,008% (bezogen auf den Biuret-Eiweißgehalt) nachweisbar und bildete bei dieser Antigen-Konzentration ein gerade noch sichtbares Präzipitat im Kaseinbereich. Diese Konzentration

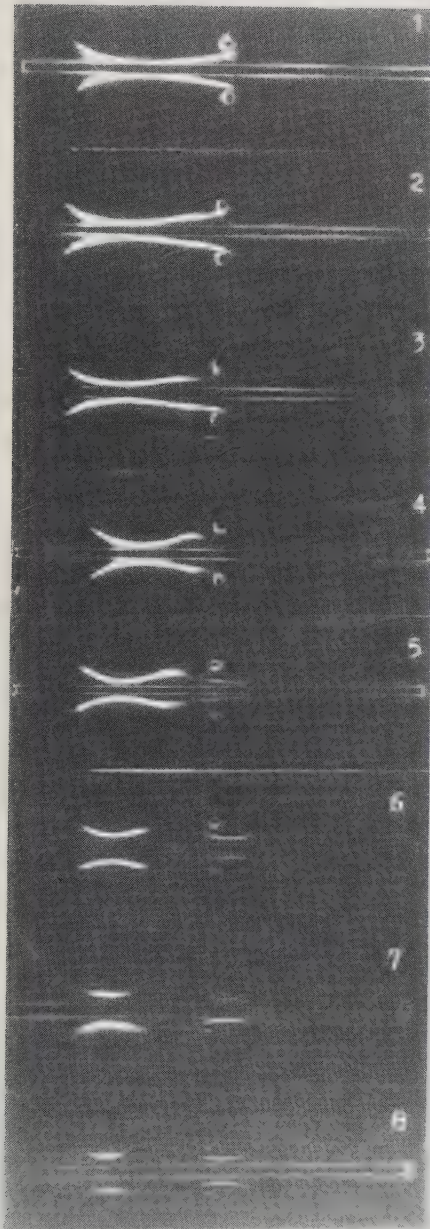
ließ sich sowohl mit dem Anti-Gervita-Serum 24 als auch 25 nachweisen, wobei bei der Verwendung von Antiserum 24 noch zusätzlich zum Gervitabogen Präzipitate hauptsächlich im kathodischen Bereich entstanden, die auf Reaktionen dieses Antiserums mit nichtmilchspezifischen Milchproteinen zurückzuführen sind, hier offensichtlich Immunglobuline, die sowohl in der Milch als auch im Rinderserum vorkommen. Bei der Titerbestimmung in der UHLENHUTH-Präzipitation reagierte dieses Anti-Gervita-Serum 24 mit Rinderserum und Rindermuskelextrakt. Die Anwendbarkeit dieses Antiserums ist deshalb für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischwaren begrenzt.

Die Verdünnungsreihen mit unerhitztem Rovita lieferten bei gleichen Konzentrationen Präzipitate, die mit denen des unerhitzten Gervita identisch waren. Ebenso existierten bei immunoelektrophoretischen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen rohem und 15 Min. gekochtem Gervita gleicher Konzentration (vgl. Abb. 1+9). Im Gegensatz zum rohen Gervita lieferten die Verdünnungsreihen mit 15,30 und 60 Min. bei 120°C autoklaviertem Gervita Präzipitationsbanden, die viel länger und flacher ausgebildet waren und sich vom β -Lactoglobulin- über den Kasein- bis zum α -Lactalbumin-Bereich erstreckten, wobei der anodische Schenkel viel weiter in den β -Lactoglobulin-Bereich hineinragte als es bei rohem oder gekochtem Gervita beobachtet wurde. Der kathodische Schenkel war im Gegensatz zur gleichen Konzentration von rohem bzw. gekochtem Gervita flach auslaufend und etwas zerfasert, auch fehlte die starke Aufkrümmung, die von der Antiserum-Rinne hinwegführt.

Wie schon beim rohen Gervita beobachtet, änderte sich auch bei der Verwendung von autoklaviertem Material die Ausbildung der Präzipitate in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration. Mit fallender Konzentration verkürzten sich die Präzipitationsbanden von den Schenkelenden her. In niederen Konzentrationen blieb nur der zentrale im Kaseinbereich liegende Teil übrig, der jedoch im Gegensatz zu rohem und gekochtem Gervita nicht mehr in einem scharf konturierten, kurzen, geschwungenen Bogen verlief, sondern nur ganz schwach gekrümmt war und in etwas diffus ankräbblbaren kurzen Schenkelenden auslief.

Bei den vergleichenden immunelektrophoretischen Untersuchungen von 15, 30 und 60 Min. bei 120°C autoklavierter Gervitalösung konnte festgestellt werden, daß unabhängig von der zuvor einwirkenden unterschiedlich langen Temperaturbeeinflussung gleiche Antigenkonzentrationen gleichgeformte Präzipitationsbögen lieferten (Abb.10). Die quantitative Differenzierung unterschiedlich konzentrierter autoklavierter Gervitalösungen war mit Hilfe der Immunelektrophorese unter Verwendung des Anti-Gervita-Serums 25 in den Konzentrationen zwischen 2% und 0,5% kaum möglich, dagegen ließen sich Konzentrationen von 0,6;0,4;0,2;0,1;0,05 und 0,025% (vgl.Abb.11 bis 16) einer autoklavierten (15,30 oder 60 Min.) Gervitalösung deutlich unterscheiden. Der qualitative Nachweis einer 60 Min. bei 120°C autoklavierten Gervita-Lösung war bis zu einer Konzentration von 0,01% (bezogen auf den Biuret-Eiweißgehalt) möglich, das entspricht einer Antigenverdünnung von 1:5000. Auf Grund dieses Ergebnisses wäre es möglich, die besprochenen Gervita-Verdünnungsreihen als "Eichreihen" für den quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischwaren zu verwenden. So könnten die Ergebnisse der i.e. Untersuchungen von Brühwürsten mit rohen bzw. gekochten Gervitalösungen und die von hocherhitzten Fleischwaren mit autoklavierten Gervitalösungen verglichen werden. Die Übereinstimmung in den Ergebnissen der i.e. Untersuchungen von Gervita und Rovita ließ die Annahme zu, daß mit einem Anti-Gervita-Serum auch andere in der Fleischwarenproduktion verwendete aufgeschlossene Milcheiweißpräparate i.e. nachweisbar sind. Gervita-Präzipitate werden offensichtlich fast ausschließlich aus den Kasein entsprechenden Antigenkomponenten gebildet, da in niederen Konzentrationen jeweils das im Kaseinbereich liegende Zentrum des Präzipitates erhalten blieb. Reine Kaseinpräzipitate waren jedoch in gleichen Konzentrationen sehr viel kürzer, gebogener und feiner konturiert als die Gervita-Präzipitate, an deren Bildung offensichtlich noch andere Proteine, eventuell β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin beteiligt zu sein scheinen. Jedoch konnte diese Vermutung durch entsprechende Untersuchungen nicht bewiesen werden. Eine bei der Gervitaherstellung durch chemische Einflüsse bedingte gewisse Veränderung ("Aufschließung") schien nicht ausgeschlossen.

Abb.Nr.	Antigen: Gervita roh	Antiserum Nr.
---------	-------------------------	------------------



1	2,6 2,3	25
2	1% 1%	25
3	0,5% 0,5%	25
4	0,25% 0,25%	25
5	0,1% 0,1%	24
6	0,04% 0,04%	24
7	0,02% 0,02%	24
8	0,01% 0,01%	24

Für die Abb.5 bis 8 wurde das Anti-Gervita-Serum 24 benutzt.
Die Erklärung für das zusätzlich in der Nähe des Antigenbassins
auftretende feine Präzipitat befindet sich im Text (S.43).

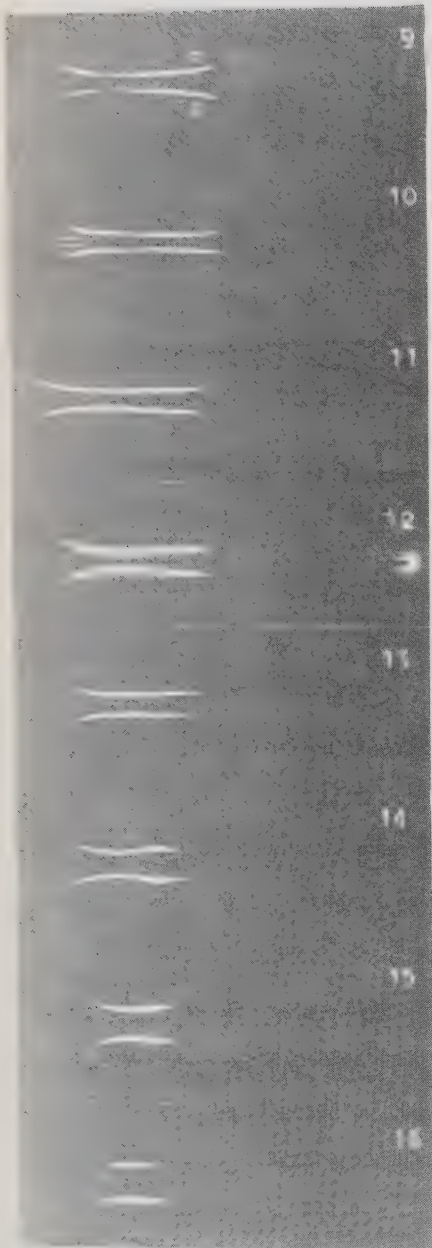
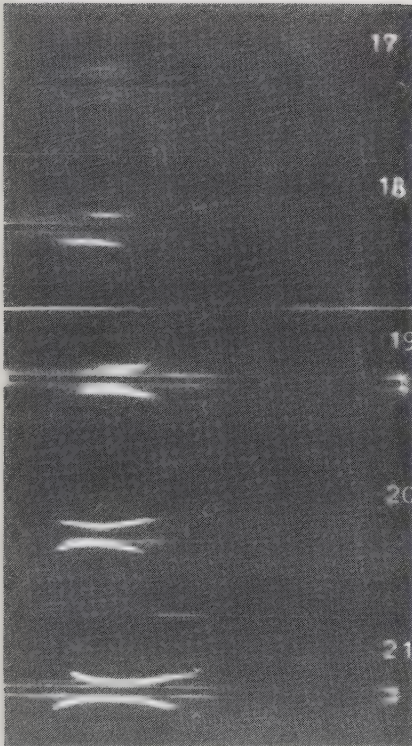


Abb.Nr.	Antigen
9	2,0% G.gekocht 2,0% G.gekocht
10	2,0% G.autoklav. 2,0% G.autoklav.
11	0,6% G.autoklav. 0,6% G.autoklav.
12	0,4% G.autoklav. 0,4% G.autoklav.
13	0,2% G.autoklav. 0,2% G.autoklav.
14	0,1% G.autoklav. 0,1% G.autoklav.
15	0,05% G.autoklav. 0,05% G.autoklav.
16	0,025% G.autoklav. 0,025% G.autoklav.

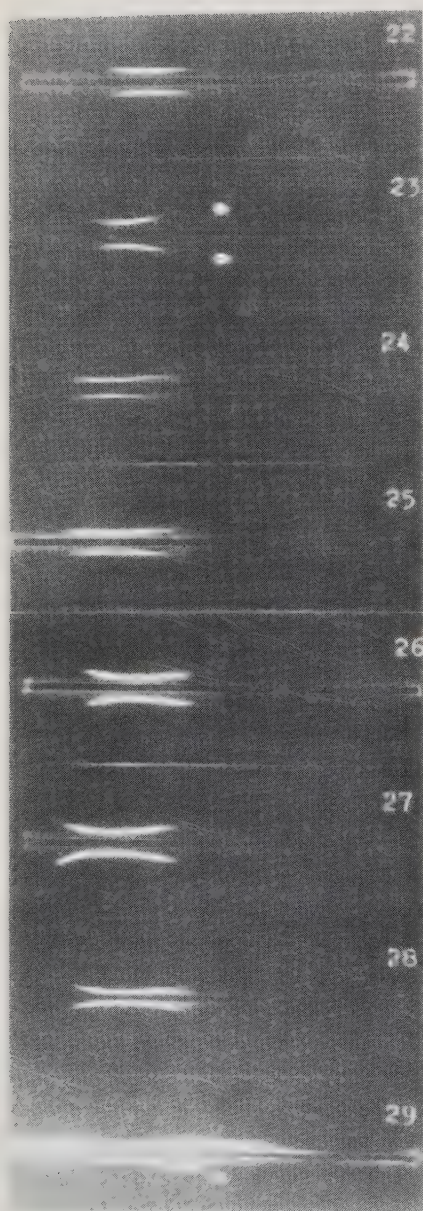
Für die Abb.9 bis 16 wurde Anti-Gervita-Serum 25 verwendet
G = Gervita

Abb.Nr. Antigen:
Brühwurstextrakte



17	mit 0,25% 0,25%
18	0,5% 0,5%
19	1,0% 1,0%
20	2,0% 2,0%
21	4,0% 4,0% Gervita- Zusatz zum Brühwurstbrät

Die abgebildeten Präparate (Abb.17 bis 21) wurden mit dem Anti-Gervita-Serum 25 hergestellt. Die Brühwurstextrakte in den oberhalb der Antiserumrinne befindlichen Antigenbassins wurden mit phys.NaCl, die in den unteren Bassins befindlichen mit heißgesättigter Natriumoxalatlösung hergestellt.



22	Lebercreme 1,0%
23	Schinkenwurst 1,5%
24	Gutsleberwurst 1,5%
25	Westfäl. Landleberwurst 2,0% (verdünnter Extrakt)
26	Frühstücksfleisch I 2,0%
27	Frühstücksfleisch II 2,0%
28	Frühstücksfleisch III 2,0%
29	Frühstücksfleisch IV 2,0%

Zur Herstellung der Präparate 22 bis 29 wurde das Anti-Gervita-Serum 25 benutzt. Die beiden Antigenbassins eines jeden Präparates enthalten gleiche Extrakte.

sen zu sein und könnte die Ursache sein für die Verschmelzung einzelner Proteinkomponenten zu einer einzigen langen, jedoch deutlich geschwungenen Präzipitationslinie, deren Enden gespalten waren. Wie bei autoklavierter Gervitalösung beobachtet, schienen hohe Temperaturen das Präzipitat zusätzlich zu verlängern unter gleichzeitiger Abnahme der Bogenkrümmung. Dieser wahrscheinlich durch Hitzedenaturierung bedingte Vorgang wurde auch bei vergleichender Betrachtung von erhitztem und autoklaviertem Lab- und Säurekasein beobachtet.

3.2 Ergebnisse der Hauptversuche

Modellbrühwürste

Die Extrakte der Modellbrühwürste bildeten in allen geprüften Milcheiweißkonzentrationen im Kaseinbereich Präzipitate, deren Stärke von der Höhe des Milcheiweißzusatzes abhängig war. Die negative Kontrolle dagegen, Brühwurst ohne Milcheiweißzusatz, wies mit dem Anti-Gervita-Serum keine Präzipitationsbanden auf.

Das nach dem für die i.H. von KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966) angegebene Extraktionsverfahren bearbeitete Untersuchungsmaterial lieferte bei i.e. Untersuchungen erst oberhalb von 2% Milcheiweißzusatz sichtbare Präzipitate. Vergleichende Untersuchungen der unterschiedlich extrahierten Versuchsmaterialien zeigten, daß eine bei Zimmertemperatur stattfindende 24stündige Extraktion fein zerkleinerter Brühwürste in phys.NaCl, die kochend auf das Material gegeben wurde, für den i.e. Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß ausreichend war. Eine Verlängerung der Extraktionsdauer auf 48 Stunden sowie die Anwendung von Natriumoxalat als Extraktionsmittel verbesserten die Löslichkeit von Milcheiweiß in einer Fleischware nicht. So erforderte die I.E. auch keine Dialyse des verwendeten Materials, denn dialysierte und nichtdialysierte Extrakte brachten die gleichen Ergebnisse. Der Ablauf der Reaktion schien durch echt gelöste Stoffe (z.B. Gewürzsubstanzen) im Untersuchungsextrakt nicht beeinträchtigt zu werden. Wie schon bei den i.e. Untersuchungen von Milcheiweißlösungen

beobachtet wurde, erfolgte auch bei Brühwurst-Untersuchungen die Art der Ausbildung von Präzipitationsbanden in starker Abhängigkeit von der Höhe des Milcheiweißgehaltes der Brühwürste. Bei einem Milcheiweißzusatz von 4% (Abb.21) entstand im Kaseinbereich ein kräftig ausgebildeter, gleichmäßig gekrümmter Präzipitationsbogen, dessen kathodisches Ende sich fast bis zum Antigenbassin erstreckte und zerfasert erschien. Das anodische Bogenende bestand aus einem kräftigen, kurzen, stark gekrümmten Schenkel und einer feinen, langen und ganz flach parallel zur Antiserum-Rinne verlaufenden Präzipitationslinie. Dieses an den Enden aufgespaltene Präzipitat kann nur auf Reaktionen mit dem Milcheiweiß zurückgeführt werden, da die negative Kontrolle (Brühwurst ohne Milcheiweiß) mit demselben Antiserum keine sichtbaren Präzipitate lieferte. Mit abnehmendem Milcheiweißzusatz verkürzten sich die Präzipitate, es blieb der zentrale im Kaseinbereich liegende Teil übrig, der bei einem Zusatz von 0,25% Gervita zur Brühwurst nur noch schwach sichtbar war. Die Schenkelaufspaltungen wurden bereits ab 2% abwärts nicht mehr beobachtet.

Auf Grund der unterschiedlich geformten Präzipitate war es möglich, in Brühwurstextrakten Milcheiweißzusätze von 0,25; 0,5; 1,0; 2 und 4% voneinander zu unterscheiden (Abb.17 bis 21).

Bei vergleichender Betrachtung i.e. analysierter Extrakte milcheiweißhaltiger Brühwürste mit roher bzw. gekochter Gervitalösung entsprach ein Milcheiweißzusatz

von 0,25 %	in der Brühwurst einer 0,01%igen
von 0,5 %	einer 0,02%igen
von 1,0 %	einer 0,04%igen
von 2,0 %	einer 0,1 %igen
von 4,0 %	einer 0,25%igen Gervitalösung, d.h.

daß im Durchschnitt nur etwa 10% des zugesetzten Milcheiweißes im Extrakt gelöst vorliegen. Dabei wurde der Verdünnungsfaktor der in der Fleischware vorliegenden Ausgangskonzentration durch die Extraktionsflüssigkeit bereits berücksichtigt.

Hocherhitzte Fleischwaren

Alle mit einem Zusatz zwischen 1 und 4% Milcheiweiß hergestell-

ten hocherhitzten Fleischerzeugnisse bildeten im Kaseinbereich ein dem Gervita nach Lokalisation und Ausbildung offenbar identisches Präzipitat. Die negativen Kontrollen (Rindfleisch und Rotwurst ohne Milcheiweiß) lieferten bei der i.e. Untersuchung mit dem gleichen Anti-Gervita-Serum 25 keinerlei Präzipitationsbanden. Der qualitative Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren konnte also mit Hilfe der Mikroimmunelektrophorese eindeutig geführt werden. Auch die mit milcheiweißhaltigen Fleischwarenextrakten gebildeten Präzipitate lagen mit ihrem Zentrum im Kaseinbereich und erstreckten sich größtenteils darüberhinaus anodisch bis in den β -Lactoglobulin- und kathodisch bis in den α -Lactalbumin-Bereich hinein, häufig bis über das Antigenbassin hinausragend. Zusätzlich zu diesem für aufgeschlossenes Milcheiweiß charakteristischen Präzipitat unterschiedlicher Länge bildeten einige Extrakte zwei sehr feine, langgestreckte, fast ungebogene Linien, die anodisch und kathodisch unterhalb der Schenkellenden des Hauptbogens entsprangen. Das kathodenseitige feine Präzipitat erstreckte sich bis über das Antigenbassin hinaus. Das an der Anodenseite liegende Präzipitat erreichte fast das Ende der Antiserumrinne.

Bei den hocherhitzten Handelserzeugnissen war es nicht möglich, zwischen der Stärke der Präzipitationsreaktion und Höhe des angegebenen Milcheiweißzusatzes Beziehungen zu finden.

Der Extrakt einer "mit 1% Milcheiweiß" hergestellten Lebercreme (Abb.22) bildete ein fast ungebogenes Präzipitat im Kaseinbereich. Im Vergleich dazu waren die mit einem 1,5%igen Material gewonnenen Präzipitate entweder bei gleicher Präzipitatlänge deutlich gebogen (Abb.23) oder verlängert (Abb.24).

Die Fleischwaren, deren Milcheiweißzusatz mit 2% angegeben wurde, bildeten unterschiedlich geformte Präzipitationsbanden, die - verglichen mit autoklavierter Gervitalösung - einer Konzentration von 0,6% bis 0,1% entsprechen, also eine erhebliche Schwankungsbreite aufwiesen.

Lediglich gleichartige Produkte lieferten vergleichbare Er-

gebnisse. So bildeten vier Extrakte, die aus Frühstücksfleisch, Produkte vier verschiedener Firmen, gewonnen wurden und deren Milcheiweißgehalt mit 2% angegeben wurde, mit dem Anti-Gervita-Serum 25 einander ähnlich geformte Präzipitate (Abb.26 bis 29), die auf gleiche Reaktionsstärke bzw. gleich hohen Milcheiweißzusatz schließen ließen. Bemerkenswert war dieses Ergebnis besonders im Hinblick auf den unterschiedlichen Gesamteiweißgehalt (Biuret-Eiweiß) der Extrakte, der zwischen 0,7 und 2,34 g% lag.

Die mit 4% Milcheiweiß hergestellte Rindfleischkonserve bildete einen Präzipitationsbogen, der sich von einigen mit 2% Milcheiweiß deklarierten Fleischwaren wenig unterschied. Extrakte aus Fleischwaren, die mit 2% Milcheiweiß hergestellt und mit der doppelten Menge phys.NaCl extrahiert wurden, also mit 1%igem Untersuchungsmaterial vergleichbar waren, ähnelten bei der i.e. Untersuchung jedoch mehr dem mit 1,5 bis 2% Milcheiweiß hergestellten Untersuchungsmaterial (Abb.25). Der Versuch, den Gesamteiweißgehalt des Extraktes bei der quantitativen Auswertung der gebildeten Milcheiweiß-Präzipitate als Bezugsgröße einzusetzen, erwies sich als nicht verwertbar.

Extrakte aus der mit 4% Milcheiweiß hergestellten Rindfleischkonserve bildeten bis zu einer Verdünnung von 1:64 noch sichtbare Milcheiweiß-Präzipitate. Danach läge in hochoverhitzten Fleischwaren die Nachweisgrenze für den Zusatz von aufgeschlossenem Milcheiweiß bei 0,06%.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Vorversuche

Die in der I.E. mit Hilfe von Anti-Gervita-Seren gebildeten Präzipitate waren in der Hauptsache Reaktionsprodukte des Kaseins, welches bei der industriellen Herstellung chemisch modifiziert wurde und geringe Beimischungen von Molkenproteinen eventuell auch Serumproteinen enthält.

Mit dem Anti-Gervita-Serum 25 waren durch i.e. Analysen rohe Gervitalösungen in den Konzentrationen von 2,0; 1,0; 0,5;

0,25; 0,1; 0,04; 0,02 und 0,01% und autoklavierte von 0,6; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 und 0,025% voneinander zu unterscheiden. Unerhitztes Gervita, unerhitztes Rovita sowie 15 Min. gekochtes Gervita lieferten gleichgeformte Präzipitate. Bei i.e. Untersuchungen von 15, 30 und 60 Min. autoklavierten Gervitalösungen wurden bei gleichen Konzentrationen gleiche Präzipitate erhalten. Die Nachweisgrenze mit Hilfe des Anti-Gervita-Serums 25 lag bei rohem Gervita bei einer Konzentration von 0,008%, bei autoklavierten bei 0,01%.

Hauptversuche

Modellbrühwürste

Bei Brühwürsten waren Milcheiweißzusätze zwischen 0,25% und 4% qualitativ und quantitativ zu erfassen. Der extrahierbare Anteil des Milcheiweißzusatzes zu einer Brühwurst war sehr gering und betrug nur etwa 10%.

Hoherhitzte Fleischwaren

Bei hoherhitzten Fleischwaren war ein qualitativer Nachweis eines Zusatzes von aufgeschlossenem Milcheiweiß eindeutig zu führen. Die Nachweisgrenze bei Verwendung des Anti-Gervita-Serums 25 (Titer 1:256000) lag bei einer Milcheiweiß-Konzentration von etwa 0,06%. Eine quantitative Auswertung war nur innerhalb eines recht weiten Streubereiches und nur bei Vorliegen von Informationen über die sonstige Zusammensetzung und Herstellung der Ware möglich.

IV. Diskussion

1. Immunisierung

Die Empfindlichkeit und Spezifität serologischer Nachweismethoden hängt in erster Linie von Titerhöhe und Spezifität der verwendeten Antisera ab. Durch Immunisierung von Kaninchen mit erhitztem aufgeschlossenem Milcheiweiß und FREUNDschem Adjuvans ist die Herstellung qualitativ hochwertiger sog. Thermo-Antisera gelungen. Die von RING (1964) mit Hilfe von Metalladjuvantien erzielte Steigerung der Antikörperproduktion gegen erhitztes, alkalisiertes Milcheiweiß konnte mit der hier benutzten intravenösen Injektion von Aluminiumhydroxyd nach WILLSTÄTTER nicht erreicht werden. Die mit FREUNDschem Adjuvans erzielten Ergebnisse entsprachen den von RUCKLI (1962) gewonnenen guten Resultaten bei der Immunisierung mit Pferde- und Menschenserum bei subcutaner Anwendung von FREUNDschem Adjuvans. Allerdings ließ sich dieses Ergebnis nicht mit allen Antigenen reproduzieren.

Die Verwendung von aufgeschlossenem Milcheiweiß zur Immunisierung hatte gegenüber Magermilch und Kasein den Vorzug, daß das gewonnene Antiserum homologe Antikörper gegen entsprechende bei der Fleischwaren-Herstellung benutzte Zusatzstoffe besitzt, die in der Hauptsache aus durch Aufschlußmittel chemisch verändertem Kasein bestehen. Daneben sind kleinste Beimischungen verschiedener Molkenproteine enthalten, die bei Verwendung von unerhitztem aufgeschlossenem Milcheiweiß für die Immunisierung offensichtlich die unspezifischen Reaktionen mit Rinder Serum und Rindermuskelextrakt verursachten. Dieser Nachteil wurde bei der Verwendung von gekochtem aufgeschlossenem Milcheiweiß vermieden. Sie bietet den Vorteil höherer Spezifität, da die für die immunogene Polyvalenz des unerhitzten Materials verantwortlichen milchunspezifischen Serumproteine bei der angewendeten Temperatur inaktiviert werden, während das Kasein keine Einbuße seiner serologischen Aktivität erleidet. Schon GRÄTZ (1911) stellte fest, daß die mit gekochter Milch hergestellten sog. Coctolactosera reine Kasein-Antisera sind. Um die Hitzebeeinflussung, der das auf

geschlossene Milcheiweiß bei der Fleischwaren-Herstellung unterliegt, zu reproduzieren, wären bei der Antigenezubereitung Temperaturen von ca. 120°C nötig. Doch auch das hitzestabile Kasein ist nach Erhitzung auf 120°C in seiner Löslichkeit beeinträchtigt (1). Darum mußte auch mit einer Beeinflussung der serologischen Aktivität gerechnet werden, weshalb nur auf 100°C erhitzt wurde. Die so gewonnenen Antiseren reagierten bei der Ringpräzipitation größtenteils mit gleicher Titerhöhe gegen unerhitztes und gekochtes aufgeschlossenes Milcheiweiß und waren in der I.E. und i.H. für den Nachweis von Milcheiweiß in hocheerhitzten Fleischwaren sehr gut geeignet.

Es scheint so, daß die Herstellung von Anti-Seren gegen erhitztes aufgeschlossenes Milcheiweiß weniger schwierig ist als die Gewinnung brauchbarer Antiseren gegen erhitzte Serum- und Muskeleiweiße.

2. Extraktionsverfahren

Die biologische Eiweißdifferenzierung erfordert das Vorliegen einer ausreichenden Menge gelösten Eiweißes in dem Untersuchungsmaterial. Diese Voraussetzung wird gerade im erhitzten Material häufig zum Problem (2). Das von KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966) für die i.H. angegebene Extraktionsverfahren, bestehend aus Lyophilisation, 48stündiger Extraktion des zerkleinerten Untersuchungsmaterials bei $+4^{\circ}\text{C}$ und Dialyse, erbrachte gegenüber vereinfachten Verfahren ohne Lyophilisation keine verbesserte Löslichkeit des aufgeschlossenen Milcheiweißes. Eine Extraktionsdauer von nur 24 Stunden, allerdings bei Zimmertemperatur, führte zu ausreichenden Mengen gelösten Milcheiweißes. Die Extrakte wurden bei Zimmertemperatur hergestellt, um das in der Fleischware enthaltene Fett in einer Konsistenz zu halten, die die Extrahierfähigkeit des Milcheiweißes nicht behindert. Bei Temperaturen von $+4^{\circ}\text{C}$ überzieht das Fett möglicherweise die zerkleinerten mit Milch-

(1) JENESS und PATTON (1959)
(2) SINELL (1960)

eiweiß gemischten Partikel wie ein Film und verhindert dadurch eine ausreichende Extraktion der Proteine. Die phys. NaCl wurde im kochenden Zustand auf das zerkleinerte Untersuchungsmaterial gegossen und beides kräftig geschüttelt, um die Löslichkeit des aufgeschlossenen Milcheiweißes zu erhöhen. Im Verlauf der Versuchsdurchführung wurde beobachtet, daß gekochtes Gervita nur in mindestens auf 50°C erhitzter phys.NaCl-Lösung gelöst werden konnte. Die ziemlich hohe Temperatur von 100°C wurde gewählt, da bei Vermischung mit dem Untersuchungsmaterial sehr rasch ein Temperatur-Abfall erfolgt. Die Anwendung einer 48stündigen Extraktionsdauer erhöhte den Anteil gelösten Milcheiweißes im Extrakt nicht, vergrößerte aber die Gefahr einer starken Keimvermehrung, die bei der I.E. zur Besiedlung des Agar-Gels führte. Das von v.BAAL und LEGET (1965) für den papierelektrophoretischen Nachweis von Kasein und Natriumkaseinat in Fleischwaren benutzte Natriumoxalat zur Lösung von Milcheiweiß hat sich als Extraktionsmittel der phys.NaCl als nicht überlegen erwiesen, wenigstens soweit es die i.e. Untersuchung betrifft. Die in der Literatur von zahlreichen Verfassern (1) beschriebene Verringerung der Löslichkeit erhitzter Proteine scheint Kasein weitaus weniger zu betreffen als beispielsweise Molken-, Blutserum- und Muskelproteine, denn sogar aus hocherhitzten Fleischwaren ließ sich Kasein bzw. aufgeschlossenes Milcheiweiß ebenso gut in Lösung bringen wie aus Brühwürsten oder unerhitztem Material.

3. Die Problematik der indirekten Hämagglutination

Es war eine Aufgabe dieser Arbeit, serologische Methoden zum Nachweis aufgeschlossenen Milcheiweißes zu überprüfen. Dazu wurde die bereits zu diesem Zweck von KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966) variierte Methode der i.H. benutzt und mit den Ergebnissen der Immunelektrophorese in ihrer qualitativen

(1) FLASCHENTRÄGER und LEHNARTZ (1951); HAUROWITZ (1960); JAENICKE (1965); JENESS und PATTON (1959); H. SCHMIDT (1955); SINELL (1960); STAUFF (1960)

und quantitativen Aussage verglichen. Mit der i.H. soll Milcheiweiß in bis auf 115°C erhitzter Gervitalösung und Wurstmaterial noch in Mengen von 0,1% quantitativ erfaßt werden können (1). Die beschriebenen Resultate konnten in eigenen Versuchen nur teilweise bestätigt werden. Mit dem Anti-Gervita-Serum 25 war mit Hilfe der i.H. eine Unterscheidung nativer sowie 30 Min. auf 70°C erhitzter Gervitalösung in den Konzentrationen von 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 und 2% möglich. Sehr ungenau wurden die Resultate mit Fleischwarextrakten. Unter Verwendung des Anti-Gervita-Serums 25 ergaben sich bei der Untersuchung von Modellbrühwürsten mit Milcheiweißzusatz von 0,25 bis 4% regellose Titerabschwächungen (Hämagglutinationstiter), die in keinem Zusammenhang mit der Menge des Milcheiweißzusatzes standen. Einige Male trat bei einem Milcheiweißzusatz vom 0,25% statt der erwarteten Titerverminderung gegenüber der negativen Extraktkontrolle eine Erhöhung des Hämagglutinationstiters auf, so daß der qualitative Nachweis sogar fraglich erschien. Gleiche Beobachtungen konnten mit hochehitzten Fleischwaren gemacht werden. Die Diskrepanz zwischen der exakten Unterscheidungsmöglichkeit einzelner Gervitakonzentrationen und die unabhängig vom Milcheiweißzusatz auftretenden Titerabschwächungen bei Fleischwaren gab Anlaß zu der Annahme, daß die i.H. in starkem Maße von Fremdeinflüssen abhängig ist, die in Lebensmitteln und besonders in Fleischerzeugnissen unterschiedlichster Art sein können. Abgesehen von den unbefriedigenden Ergebnissen ergaben sich auch einige Schwierigkeiten bei der Durchführung der i.H. Für eine Versuchsreihe, in der maximal 7 Materialproben durch eine Person untersucht werden konnten, waren einschließlich der Extrakt- und Serumkontrollen 10 ml Antiserum notwendig. Lag die Anzahl der Materialproben unter 7, so war der Antiserum-Verbrauch zwar absolut geringer, jedoch noch unrationeller, da jeweils 3 ml Antiserum unabhängig von der Anzahl der untersuchten Proben für die Kontrollen benötigt wurden.

Dem Vorteil der Einsparung apparativer Sonderausrüstungen steht

(1) KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966)

der Nachteil ziemlich umfangreicher Arbeitsaufwendungen gegenüber. So war allein zur Sensibilisierung der Erythrozyten ein 14maliges Zentrifugieren notwendig; abgesehen davon mußte auch stets frisches Hammelblut zur Verfügung stehen.

Der Beurteilung der Reaktion hafteten einige Schwierigkeiten an: Besonders schwache Hämagglutinationserscheinungen waren nur schwer von negativen Reaktionen abzugrenzen.

Hoher Serumbedarf, umfahreicher Arbeitsaufwand und das Fehlen objektiver Beurteilungskriterien bei schwachen Hämagglutinationsreaktionen erscheinen bei der i.H. - namentlich bei sehr umfangreichen Untersuchungen - als fühlbarer Mangel.

4. Die Nachteile anderer serologischer Methoden

Von allen bekannten serologischen Nachweismethoden böte sich die Ringpräzipitation nach UHLENHUTH als einfachste quantitative Methode an. Jedoch verlangt diese Arbeitsweise die Anwendung klarer Extrakte. Die aus Fleischwaren hergestellten Extrakte sind jedoch häufig getrübt. SCHEIBNER (1959) arbeitete mit der Methode nach OUCHTERLONY und verwendete dabei auch getrühte Extrakte, ohne jedoch eine quantitative Aussage machen zu können. Ebenfalls die Methode nach OUCHTERLONY wandten WYLER und SIEGRIST (1965) an. Es gelang ihnen zwar, Milcheiweißzusätze ab 0,1% qualitativ nachzuweisen, eine quantitative Bestimmung war ihnen mit der Agar-Gel-Diffusionsmethode aber nicht möglich. Die von HANSON (1964) beschriebene "comparative" I.E. soll eine Nachweisgrenze für Milcheiweiß bei 0,1% (Milcheiweißzusatz zu Trockenplasma) haben. Diese Methode besitzt zwar bei Anwendung von Anti-Kolostrum-Seren, die mit Rinderserum abgesättigt sind, eine hohe Spezifität, bietet jedoch im Gegensatz zur einfachen I.E. kaum eine Möglichkeit zur quantitativen Auswertung.

5. Die Vorzüge der Immunelektrophorese

Verglichen mit anderen serologischen Methoden, insbesondere der i.H., bietet die I.E. eine Reihe von Vorzügen.

Bei der Verwendung gleicher Anti-Gervita-Seren wies die I.E.

eine etwa zehnfach höhere Empfindlichkeit auf als die i.H. Die Nachweisgrenze mit der I.E. lag bei einer Konzentration von 0,008% (rohe Gervitalösung) bzw. 0,01% (autoklavierte Gervitalösung). Sie lag damit weit unter den Werten für die i.H. und andere serologische Methoden (1).

Die I.E. gestattete eine exakte qualitative Aussage, die sich auf das Vorkommen oder Fehlen des zwischen Anti-Gervita-Serum und Untersuchungsextrakt gebildeten charakteristischen Milcheiweißpräzipitates stützte. Bei allen zur Untersuchung gekommenen Materialien war der qualitative Nachweis eindeutig. Die Kombination von Agar-Gel-Diffusionsmethode und Elektrophorese ermöglichte durch Feststellung der Ladungsgröße eine exakte qualitative Aussage, die mit anderen serologischen Methoden (Agar-Gel-Diffusionsmethode und auch i.H.) nicht gegeben ist.

Aus gleichem Grunde würde auch die Anwendung polyvalenter Anti-Milcheiweiß-Seren die qualitative Aussage nicht beeinflussen, da unabhängig von der Anzahl noch zusätzlich auftretender nicht milchspezifischer Präzipitate das typische, im Kaseinbereich liegende Milcheiweißpräzipitat maßgeblich ist für die Anwesenheit von Milcheiweiß im Untersuchungsmaterial.

Die I.E. ermöglichte im gewissen Rahmen auch eine quantitative Aussage, die sich aus der vergleichenden Betrachtung der bei unterschiedlichen Milcheiweißkonzentrationen unterschiedlich geformten und gefärbten Präzipitate im Kaseinbereich herleitete. Offensichtlich beeinflusste das Verhältnis zwischen Antikörper- und gelöster Antigen-Menge das Ausmaß der Immunpräzipitation und veränderte dadurch Länge und Form der im Agar-Gel entstandenen Präzipitate. Wahrscheinlich spielte neben der Stärke der AG-AK-Reaktion auch die elektrophoretische Auftrennung eine Rolle. In niederen Konzentrationen entsprachen die Milcheiweißbanden nach Lokalisation und Form reinen Kaseinpräzipitaten. Dagegen schienen in höheren Konzentratio-

(1) KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966); WYLER und SIEGRIST (1965)

nen gewisse elektrophoretische, vom Kasein nicht abtrennbare Molkeneiweißkomponenten (wahrscheinlich β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin) mitzureagieren. Es entstanden dabei ein kathodisch und anodisch verlängertes Präzipitat. Bei geringen Milcheiweißkonzentrationen wurden diese Molkeneiweiße nicht mehr erfaßt. Mit der I.E. waren sowohl rohe, gekochte und autoklavierte Gervitalösungen in verschiedenen Konzentrationen als auch Milcheiweißzusätze in Brühwürsten quantitativ zu erfassen. In hochoverhitzten Handelserzeugnissen war der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß nur innerhalb eines recht weiten Streubereichs möglich.

Auch in der Arbeitstechnik der i.e. Mikroanalyse ergaben sich gegenüber der i.H. einige erhebliche Vorteile.

Der Antiserumverbrauch war äußerst gering. Zur Untersuchung eines Extraktes wurden nur 0,04 ml Antiserum benötigt.

Die Analysen erfordern zwar eine apparative Sonderausrüstung, der Arbeitsaufwand hielt sich dafür sehr in Grenzen. Mit der benutzten LKB-Ausrüstung konnte innerhalb von 4 Tagen eine Versuchsreihe von maximal 72 Proben analysiert werden, wozu insgesamt nur 3 - 4 ml Anti-Milcheiweiß-Serum benötigt wurden.

Die Ergebnisse lassen sich, zumindest was die qualitative Aussage anbetrifft, objektiv beurteilen. Sie konnten im Original zwecks Dokumentation aufbewahrt werden, ein Vorteil, den die i.H. nicht bietet.

Die Summe der aufgezählten Vorzüge zeigt die Überlegenheit der I.E. gegenüber anderen bekannten serologischen Methoden beim Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß, insbesondere erhitztes Material betreffend.

6. Die Problematik des quantitativen Nachweises mittels serologischer Methoden

Serologische Reaktionen quantitativ auszuwerten, ist nur möglich, wenn eine konstante Bezugsgröße vorhanden ist. Exakte Konzentrationsangaben setzten Beziehungen zwischen der Ausgangskonzentration im Untersuchungsmaterial und im daraus gewonnenen Extrakt voraus. Wird bei den Extraktionen das Verhält-

nis zwischen Untersuchungsmaterial und Extraktionsflüssigkeit standardisiert und die bei der Extraktion stattfindende Verdünnung der extrahierbaren Proteine berücksichtigt, so ist durch Vergleich mit einer standardisierten "Eichreihe" auch eine quantitative Aussage möglich. Diese "Eichreihe" müßte für jede Warengattung bzw. für jede technologische Behandlungsart gesondert aufgestellt werden.

In hocharhitzten Waren ist das Verhältnis zwischen Milcheiweiß-Ausgangskonzentration in der Fleischware und im Extrakt durch thermisch bedingte serologische Inaktivierung verzerrt. Diese Tatsache betrifft alle serologischen Nachweismethoden und stellt ein erhebliches Problem dar. Die unterschiedliche Vorbehandlung und damit das Ausmaß der Hitzeschädigung (z.B. Löslichkeitsverminderung) und damit der serologischen Inaktivierung des aufgeschlossenen Milcheiweißes sind bei einem fraglichen Material meist nicht bekannt.

Hier ist der Reaktionsausfall nicht ohne weiteres mit dem Standard einer "Eichreihe" in Beziehung zu setzen. Die Ausgangskonzentration ist also nicht einfach ablesbar. Außerdem fehlen noch Unterlagen über den Grad der serologischen Inaktivierung des aufgeschlossenen Milcheiweißes bei Temperaturen zwischen 100 und 120°C und bei verschiedenen Erhitzungszeiten in verschiedenen Fleischerzeugnissen. Hierzu wären weitere Versuche notwendig.

Unabhängig davon aber sind bei allen handelsüblichen Vollkonserven wegen der hohen Empfindlichkeit der mikroimmunoelektrophoretischen Methode Überschreitungen der festgesetzten Toleranzwerte sicher nachzuweisen. Darüber hinaus ist auch in einem weit niedrigeren Konzentrationsbereich bei Kenntnis der sonstigen technologischen Daten des betreffenden Untersuchungsmaterials eine zumindest halbquantitative Aussage möglich.

Zusammenfassung

Aufgabe dieser Arbeit war es, serologische Methoden zum Nachweis aufgeschlossenen Milcheiweißes zu überprüfen. Dazu wurde die zum gleichen Zweck von KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966) variierte Methode der indirekten Hämagglutination benutzt und mit den Ergebnissen der Immunelektrophorese in ihrer qualitativen und quantitativen Aussage verglichen. Bei der Herstellung hochwertiger Anti-Milcheiweiß-Seren wurden mehrere Immunisierungsmodi benutzt. Die besten Antiseren konnten mit gekochtem Gervita bei intracutaner Anwendung von FREUNDschem Adjuvans hergestellt werden. Der homologe Titer besaß eine Höhe von 1:256000 (bezogen auf Biuret-Eiweiß). Mit der indirekten Hämagglutination war es möglich, rohe und erhitzte Gervitalösung in den Konzentrationen von 2,0 bis 0,1% quantitativ zu differenzieren. Im Gegensatz zu den in der Literatur (1) beschriebenen Ergebnissen, konnte in eigenen Versuchen Milcheiweißzusatz zu Modellbrühwürsten (0,25 bis 4%) und hochoerhitzten Fleischwaren (1 bis 4%) quantitativ nicht erfaßt werden, sogar der qualitative Nachweis war häufig in Frage gestellt. Offensichtlich führte eine starke Empfindlichkeit der i.H. gegenüber Fremdeinflüssen, die in Fleischwaren unterschiedlicher Art sein können, zu dem unbefriedigenden Ergebnis.

Mit Hilfe der Immunelektrophorese war die Differenzierung von Konzentrationen bis hinunter zu 0,01% (rohe und gekochte Gervitalösung) bzw. 0,025% (autoklavierte Gervitalösung) möglich.

In Modellbrühwürsten war im Gegensatz zur i.H. ein Milcheiweißzusatz von 4% bis 0,25% mit deutlich konzentrationsabhängigen Abstufungen immunelektrophoretisch nachweisbar.

In hochoerhitzten Fleischwaren konnte der qualitative Milcheiweißnachweis mit Hilfe der Immunelektrophorese eindeutig geführt werden. Die quantitative Auswertung hingegen war nur innerhalb eines recht weiten Streubereiches möglich. Sie dürf-

(1) KOTTER, HERRMANN und CORSICO (1966)

te nur beim Vorliegen von Informationen über die Zusammensetzung und technologische Behandlung der Ware exakt durchführbar sein.

Wegen ihrer überaus großen Empfindlichkeit und Spezifität und des geringen Arbeitsaufwandes wird die I.E. für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen als besonders geeignet angesehen.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 Abd El-Salam, M.H.
(1965): The heat stability of buffaloes' milk in relation to its composition
Indian. J. Dairy Sci. 18, 109
- 2 Aschaffenburg, R.
(1965): Variants of milk proteins and their pattern of inheritance
J. Dairy Sci. 48, 129
- 3 Aurand, L.W., J.W.Brown
u. I.G. Lecce (1963): Effect of heat on the proteins of milk as revealed by gel and immunelektrophoresis
J. Dairy Sci. 46, 1177
- 4 Baal, J.P.W. van u.
I.N. Leget (1965): Nachweis von Casein und Natrium-caseinat in Fleischprodukten
Zschr. Lebensmitteluntersuch. 127, 263
- 5 Bell, K. u. H.A.McKenzie
(1964): β -Lactoglobulins
Nature 204, 1275
- 6 Blanc, B. (1963): Les protéines du lactosérum, leur importance dans le transfert de l'immunité et le métabolisme martial
Annales Nestlé 40, 3
- 7 Blanc, B u. Isliker, H.
(1961): Isolement et caractérisation de la protéine rouge sidérophile du lait maternel: la lactotransferrine
Bull.Soc.Chim.Biol. 43, 929
- 8 Brunner, J.R. u. Mitarb.
(1960): Nomenclature of the proteins of bovine milk. First revision
J. Dairy Sci. 43, 901
- 9 Coulson, E.J. u.
H. Stevens (1950): The serological relationship of bovine whey albumin to serum albumin
J.Biol.Chem. 187, 355
- 10 Dean, H.R. u. R.A.Webb
(1926): The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction
J.Path.Bact. 29, 473
- 11 Dische, Z. (1927): In: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.Hrsg. von Hoppe-Seyler/Thierfelder. 10.Aufl. 3.Bd., 1.Teil S. 693

- Springer-Verl. Berlin-Göttingen-Heidelberg
- 12 Flaschenträger, B. u. E. Lehnartz (1951): Physiologische Chemie, 1.Bd. Springer-Verl. Berlin
- 13 Garnier, J. (1964): Mise au point sur la séparation, l'identification et le dosage des protéines du lait de vache a l'exclusion des caséines Ann.biol.anim. 4,163
- 14 Grabar, P. u. C.A. Williams (1955): Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélange de substances antigéniques Biochim.biophys.acta 17,67
- 15 Grätz, F. (1911): Experimentelle Studien über die Beziehungen zwischen Milch, Colostrum und Blutserum des Rindes Zschr. Immunit.forsch. 2,677
- 16 Gugler, E., M.Bein u. G.v. Muralt (1959): Über immunoelektrophoretische Untersuchungen an Kuhmilchproteinen Schweiz.med.Wschr. 89,1172
- 17 Hanson, L.A. (1964): Immunological technique for the detection of milk proteins in food products Nord.Vet.med. 16,201
- 18 Hanson, L.A. u. B.Johanson (1959): Immune electrophoretic analysis of bovine milk and purified bovine milk protein fractions Experientia 15,471
- 19 Hanson, L.A. u. J. Mansson (1961): Immune electrophoretic studies of bovine milk and milk products Acta paediatr. 50,484
- 20 Hartmann jr., G.H. u. A.M. Swanson (1965): Changes in mixtures of whey protein and κ -Kasein due to heat treatments J.Dairy Sci. 48,1161
- 21 Haurowitz, F.: 1. Eiweißdenaturierung. S.116 2. Antigene, Antikörper und Komplement. S.587 In: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Hrsg. von Hoppe-Seyler/Thierfelder, 10.Aufl. 4.Bd. 1.Teil Springer-Verl. Berlin-Göttingen-Heidelberg

- 22 Herrmann, Ch. (1963): Über den Nachweis von hitzedena-
turiertem Hühnereiklar in Fleisch-
waren mit Hilfe der indirekten
Hämagglutination
Vet.-med.Diss.München
- 23 Holpert, D. (1965): Zum histochemischen und immu-
nohistochemischen Nachweis von
Milcheiweiß in Brühwürsten
Vet.-med.Diss.München
- 24 Hunziker, H.G. u.
N.P.Tarassuk (1965): Chromatographic evidence for
heat-induced interaction of α -
Lactalbumin and β -Lactoglobulin
J.Dairy Sci. 48,733
- 25 Jaenicke, R. (1965): Wärmeaggregation und Wärmedena-
turation von Proteinen
Dechema-Monographien 56,207
- 26 Jenness, R. u. S.Patton
(1959): Grundzüge der Milchchemie
Bayer.Landwirtschaftsverl.
München-Basel-Wien
- 27 Karte, H. (1956): Untersuchungen zur Frage der
Hitzeschädigung der Milchproteine
in evaporierter Milch
Milchwiss. 11,420
- 28 Kiermeier, F. u.
O.Kirchmeier (1964): Quantitative elektrophoretische
Analyse der Milchproteine
Zschr.Lebensmitteluntersuch.
125,341
- 29 Kleczkowski, A. (1941): Zit. nach Haurowitz (21)
- 30 Kotter, L. (1964): Zur Differenzierung der Proteine
von Fleischwaren
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 77,43
- 31 Kotter, L., Ch.Herrmann
u. G.Corsico (1966): Zum quantitativen Nachweis von
aufgeschlossenem Milcheiweiß in
hocherhitzten Fleischwaren mit
Hilfe der indirekten Hämaggluti-
nation
Zschr.Lebensmitteluntersuch.
133,15
- 32 Kutscher, W., W.Nagel
u. W.Pfaff (1961): Nachweis und quantitative Be-
stimmung von Milcheiweiß in
Fleischerzeugnissen
Zschr. Lebensmitteluntersuch.
115,117

- 33 Kutscher, W. u. W.Pfaff (1959): Über die Nährwerterhöhung und Strukturserhaltung von Fleisch- und Wurstkonserven (I)
Fleischwirtsch. 11,568
- 34 Kutscher, W. u. W.Pfaff (1961): Über die Nährwerterhöhung und Strukturserhaltung von Fleisch-erzeugnissen(III)
Fleischwirtsch. 13,283
- 35 Larson, B.L. (1965): Biosynthesis of the milk proteins
J.Dairy Sci. 48,133
- 36 Larson, B.L. u. D.C. Gillespie (1957): The origin of the mayor specific proteins in milk
J.Biol.Chem. 227,565
- 37 Larson, B.L. u. K.A. Kendall (1957): Protein production in the bovine
J.Dairy Sci. 40,377
- 38 Larson, B.L. u. G.D. Rollerl (1955): Heat denaturation of the specific serum proteins in milk
J.Dairy Sci. 38,351
- 39 Lienhop, E. (1962): Über die Verwendung und den Nachweis von Milcheiweiß in Brühwurstserzeugnissen
Arch.Lebensmittelhyg. 13,262
- 40 Lindquist, B. (1963): Casein and the action of rennin
Dairy Sci.Abstr. 25,257
- 41 Morr, C.V. (1965): Effect of heat upon electrophoresis and ultracentrifugal sedimentation properties of skimmilk protein fractions
J.Dairy Sci. 48,8
- 42 Ouchterlony, Ö. (1958): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis
Progr.Allergy 5,1
- 43 Ouchterlony, Ö. (1962): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis (II)
Progr.Allergy 6,30
- 44 Pfaff, W. (1959): Über die Nährwerterhöhung und Strukturserhaltung von Fleisch- und Wurstkonserven
Fleischwirtsch. 11,986
- 45 Préaux, G. u. Mitarb. (1965): Concentration à partir du sérum de lait, de trois composants immunologiquement identiques à l' α -lactalbumine
Arch.internat.physiol. 73,1

- 46 Ring, Ch. (1964): Vermehrte Bildung von Antikörpern gegen erhitztes Eiweiß mittels Metallverbindungen
Vet.-med.Diss.München
- 47 Rose, D. (1965): Protein stability problems
J.Dairy Sci. 48,139
- 48 Roulet, D.L.A., M. Bein u. G.v. Muralt (1961): Immunelektrophoretische Untersuchungen an Kuhmilchpräparaten
Milchwiss. 16,415
- 49 Ruckli, A. (1962): Subcutane Anwendung des Freund'schen Adjuvans bei Kaninchen zur Gewinnung von Antikörpern gegen verschiedene Antigene
Schweiz.Zschr.allg.Path. 25,257
- 50 Scheibner, G. (1960): Serologische Eiweißdifferenzierung mittels Präzipitation im Agar-Gel
Mhefte Vet.med. 15,341
- 51 Scheidegger, J.J. (1955): Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse
Intern.Arch.Allergy 7,103
- 52 Schmidt, D.G. (1966): Genetische varianten van melke-reiwwitten. Vortrag
Ref. in Milchwiss. 21,237
- 53 Schmidt, H. (1955): Fortschritte der Serologie, 2.Aufl.
Verl. Steinkopff, Darmstadt
- 54 Schulte, E. u. F. Müller (1955): Elektrophoretische Studien an Milchproteinen
1. Mitteilung: Die papierelektrophoretische Trennung der Eiweißstoffe der Kuhmilch und der dazugehörigen Molke
Milchwiss. 10,90
5. Mitteilung: Die Untersuchungen von pasteurisierter Milch und Milchprodukten mit Hilfe der Papierelektrophorese
Milchwiss. 10,270
- 55 Sinell, H.-J. (1960): Versuche zum biologischen Nachweis hitzedenaturierter Muskel-Proteine
Zbl.Vet.med. 8,57

- 56 Stadelmann, W. (1962): Nachweis und quantitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen
Zschr. Lebensmitteluntersuch. 117, 24
- 57 Stauff, J. (1960): Kolloidchemie
Springer-Verl, Berlin
- 58 Thalacker, R. (1963): Die Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen
Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 59, 111
- 59 Thompson, M.P. u. Mitarb. (1965): Nomenclature of the proteins of cow's milk. Second revision.
J. Dairy Sci. 48, 159
- 60 Uhlenhuth, P. u. W. Seiffert (1930): Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels der Präcipitation mit besonderer Berücksichtigung der Technik
In: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, hrsg. von W. Kolle, R. Kraus u. P. Uhlenhuth, 3. Aufl. 3. Bd. 1. Teil S. 365
Verl. G. Fischer, Jena u. Urban & Schwarzenberg, Berlin u. Wien
- 61 Weigt, U. (1959): Papierelektrophoretische Untersuchungen an Rindermilchseren
Milchwiss. 14, 61
- 62 Wyler, O. u. J.J. Siegrist (1965): Einfache, empfindliche Nachweismethode für fleischfremde tierische Eiweißarten
Mitt. Lebensmitteluntersuch. 56, 299
- 63 Yoshino, U. u. Mitarb. (1964): Comparative study on the changes of the casein fractions on heating
Agric. Biol. Chem. (Tokyo) 28, 82
- 64 Zittle, C.A. u. Mitarb. (1962): κ -kasein, β -lactoglobulin interaction in solution when heated
J. Dairy Sci. 45, 807

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof.Dr.H.-J. Sinell,
danke ich für die Vergabe des Themas an mich und für
die mir jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Lebenslauf

Am 8. Mai 1938 wurde ich, Renate Kluge-Wilm, geb. Wilm, als Tochter des Konditor- und Bäckermeisters Paul Wilm und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Zinke, in Bad Polzin in Pommern geboren. Im Jahre 1944 besuchte ich die Volksschule in meinem Geburtsort, von 1945 bis 1952 die Grundschule in Jüterbog. Das Abitur bestand ich im Mai 1956 an der Oberschule 8 in Potsdam. Von 1956 bis 1958 war ich Praktikantin an der Biologischen Zentralanstalt Berlin in Kleinmachnow, wo ich im Mai 1958 das Examen als biologisch-technische Assistentin bestand. Von September 1958 bis August 1959 arbeitete ich als Landarbeiterin auf dem Volksgut Stolpe bei Berlin und begann mit dem Studium der Veterinärmedizin im Herbst 1959 an der Humboldt-Universität Berlin, wo ich im Juni 1961 das Physikum bestand. Vom Wintersemester 1961/62 an setzte ich mein Studium an der Freien Universität Berlin fort und beendete dort im Frühjahr 1965 das tierärztliche Staatsexamen. Das Veterinärpraktikum leistete ich an der Klinik und Poliklinik für Kleine Haustiere und der Klinik für Geburtshilfe, Klauentierkrankheiten und Tierärztliche Ambulanz der Freien Universität Berlin ab. Am 18. September 1965 erhielt ich die Approbation.

